

Monoklonale Antikörper und rekombinante Antikörperperfusionsproteine für die Diagnose des Mammakarzinoms und die Therapie des Rhabdomyosarkoms

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH Aachen
University zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Bioingenieurin

Hannah Jörißen, geb. Bruch

aus Jülich

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Rainer Fischer
 Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Dr. rer. medic. Stefan Barth

Tag der mündlichen Prüfung: 26. November 2010

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Für Papa

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|--|-----------|
| I | EINLEITUNG | 1 |
| I.1 | Tumorassoziierte Antigene und deren Bedeutung | 1 |
| I.2 | Antikörper und rekombinante Antikörperfragmente | 2 |
| I.3 | Immuntoxine | 5 |
| I.4 | RAI3 als neues Tumorantigen | 7 |
| I.4.1 | Vorkommen, Struktur und Funktion | 7 |
| I.4.2 | Bedeutung von RAI3 beim Mammakarzinom | 9 |
| I.5 | Der fetale Acetylcholin Rezeptor als neues Tumorantigen | 10 |
| I.5.1 | Vorkommen, Struktur und Funktion | 10 |
| I.5.2 | Bedeutung des fAChR beim Rhabdomyosarkom | 11 |
| I.5.3 | Der fAChR als Tumorantigen für andere Krebserkrankungen | 12 |
| I.5.4 | Antikörper gegen den Acetylcholinrezeptor | 12 |
| I.6 | Ziele der Arbeit | 13 |
| II | MATERIAL UND METHODEN | 15 |
| II.1 | Material | 15 |
| II.1.1 | Chemikalien und Verbrauchsmittel | 15 |
| II.1.2 | Geräteliste | 15 |
| II.1.3 | Allgemeine Puffer und Medien | 16 |
| II.1.4 | Medien und Antibiotika für die Kultivierung von Bakterien | 17 |
| II.1.5 | Medien und Zusätze für die Zellkultur | 17 |
| II.1.6 | Reaktionskits und Enzyme | 17 |
| II.1.7 | Antigene und Adjuvanz | 18 |
| II.1.8 | Antikörper | 18 |
| II.1.9 | Versuchstiere | 19 |
| II.1.10 | Gewebeschnitte | 19 |
| II.1.11 | Zelllinien | 19 |
| II.1.12 | Bakterienstämme | 20 |
| II.1.13 | Plasmide und Primer | 20 |
| II.2 | Methoden zur Herstellung monoklonaler Antikörper | 21 |
| II.2.1 | Immunisierung von BALB/c Mäusen | 21 |
| II.2.2 | Generierung von Hybridomazelle | 21 |
| II.2.3 | Selektion Antikörper produzierender Hybridoma-Klone | 22 |
| II.3 | Immunologische und proteinchemische Methoden | 22 |
| II.3.1 | Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay | 22 |
| II.3.1.1 | ELISA zur Bestimmung des Antikörpertiters in Mausseren | 22 |
| II.3.1.2 | ELISA zur spezifischen Bindungsanalyse von Antikörpern | 23 |
| II.3.1.3 | ELISA zur Affinitätsbestimmung monoklonaler Antikörper | 23 |
| II.3.1.4 | ELISA zur Isotypenbestimmung monoklonaler Antikörper | 24 |
| II.3.2 | SDS-PAGE und Coomassie-Färbung | 24 |
| II.3.3 | Western Blot Analyse | 25 |
| II.3.3.1 | Western Blot-Analysen von Zell-und Gewebelysaten | 26 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| II.3.3.2 | Western Blot-Analyse rekombinanter Proteine..... | 26 |
| II.3.4 | Herstellung von Zellysaten | 26 |
| II.3.5 | Durchflusszytometrie für Bindungsanalysen an Zelloberflächen | 27 |
| II.3.6 | Immunofluoreszenzfärbung und konfokale Mikroskopie | 27 |
| II.3.7 | Immunhistochemie an Paraffin-Geweben | 28 |
| II.3.8 | Reinigung monoklonaler Antikörper über Protein G Affinitätschromatographie | 29 |
| II.3.9 | Expression und Reinigung rekombinanter Proteine | 29 |
| II.3.9.1 | Periplasmatische Expression rekombinanter Proteine in <i>E.coli</i> unter osmotischen Stressbedingungen | 29 |
| II.3.9.2 | Bakterieller Zellaufschluss mittels Hochdruckhomogenisators..... | 30 |
| II.3.9.3 | Reinigung rekombinanter Proteine über Immobilisierte-Metallionen- Affinitäts-Chromatographie | 30 |
| II.3.9.4 | Reinigung rekombinanter Proteine über Ionenaustauschchromatographie | 31 |
| II.3.9.5 | Reinigung rekombinanter Proteine über Größenausschlusschromatographie | 31 |
| II.3.10 | Konzentrieren und Umpuffern von Proteinen | 31 |
| II.3.11 | Proteinkonzentrationsbestimmung | 31 |
| II.3.11.1 | Proteinbestimmung nach Bradford | 31 |
| II.3.11.2 | Proteinkonzentrationsbestimmung mittels densitometrischen Verfahren 32 | |
| II.3.12 | Serumstabilitätstest..... | 32 |
| II.3.13 | Lagerung der monoklonalen Antikörper | 32 |
| II.3.14 | Lagerung der rekombinanten Proteine..... | 32 |
| II.4 | Molekularbiologische Methoden | 32 |
| II.4.1 | Plasmid-DNA Präparation | 32 |
| II.4.2 | Agarosegelelektrophorese | 33 |
| II.4.3 | Konzentrationsbestimmung von DNA | 33 |
| II.4.4 | Polymerase-Kettenreaktion | 33 |
| II.4.5 | Restriktionsverdau von DNA | 34 |
| II.4.6 | Dephosphorylierung von DNA..... | 35 |
| II.4.7 | Reinigung der DNA nach enzymatischen Reaktionen | 35 |
| II.4.8 | Ligation von DNA | 35 |
| II.4.9 | Herstellung Hitzeschock-kompetenter Bakterien | 35 |
| II.4.10 | Hitzeschock-Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien | 35 |
| II.4.11 | Isolation der Gesamt-RNA aus Säugerzellen | 36 |
| II.4.12 | cDNA-Synthese und RT-PCR | 36 |
| II.4.13 | Herstellung von Glycerin-Stammkulturen..... | 37 |
| II.4.14 | Sequenzierung und Analyse der DNA | 37 |
| II.5 | Zellbiologische Methoden..... | 37 |
| II.5.1 | Kultivierung von Zellkulturen | 37 |
| II.5.2 | Transfektion von HEK293T Zellen | 37 |
| II.5.3 | Zytotoxizitätstest..... | 38 |
| II.5.4 | Apoptose-Test mittels Annexin-V-Bindung | 38 |
| II.5.5 | Internalisierungs-Test..... | 39 |
| II.5.6 | Bestimmung der funktionalen Affinitäten von scFv35-ETA' | 39 |
| II.5.7 | Kryokonservierung von Zellkulturen | 39 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| III | ERGEBNISSE | 40 |
| III.1 | Monoklonale anti-RAI3 Antikörper | 40 |
| III.1.1 | Immunisierung von BALB/c Mäusen | 40 |
| III.1.2 | Herstellung Antikörper produzierender Hybridomzellen..... | 42 |
| III.1.3 | Spezifische Antigenbindung der anti-RAI3 Antikörper | 42 |
| III.1.4 | Bestimmung des Ig-Isotyps der monoklonalen Antikörper..... | 43 |
| III.1.5 | Reinigung der monoklonalen anti-RAI3 Antikörper | 44 |
| III.1.6 | Kompetitiver ELISA und Affinitätsbestimmung der monoklonalen anti-RAI3 Antikörper..... | 45 |
| III.1.7 | Bindung der anti-RAI3 Antikörper an Tumorzellen..... | 46 |
| III.1.8 | Analyse der RAI3 Expression in Zelllysaten getesteter Zelllinien | 47 |
| III.1.9 | Analyse der RAI3 Expression in Gewebelysaten..... | 48 |
| III.1.10 | Herstellung RAI3-transfizierter HEK293T Zellen..... | 49 |
| III.1.10.1 | Bindung der anti-RAI3 Antikörper an RAI3-transfizierte Zellen ... | 50 |
| III.1.10.2 | Analyse der RAI3 Expression in Zelllysaten transfizierter Zellen | 51 |
| III.1.11 | Immunfluoreszenzfärbung RAI3 transfizierter Zellen..... | 52 |
| III.1.12 | Etablierung der Immunhistochemie..... | 54 |
| III.1.13 | Bestätigung der Spezifität durch Competition | 54 |
| III.1.14 | Untersuchung eines „Tissue microarray“ vom Mammakarzinom..... | 55 |
| III.2 | Untersuchung eines anti-fAChR Immuntoxins | 57 |
| III.2.1 | Untersuchung der Rhabdomyosarkom-Zelllinien | 57 |
| III.2.2 | Bakterielle Expression von scFv35-ETA' | 58 |
| III.2.3 | Reinigung des Immuntoxins | 60 |
| III.2.4 | Spezifische Bindung von scFv35-ETA' an Zielzellen | 63 |
| III.2.5 | Affinitätsbestimmung | 65 |
| III.2.6 | Internalisierung..... | 65 |
| III.2.7 | Charakterisierung der zytotoxischen Wirkung von scFv35-ETA' | 66 |
| III.2.8 | Serumstabilitätstest..... | 70 |
| III.2.9 | <i>In vivo</i> Mausversuch..... | 72 |
| IV | DISKUSSION | 74 |
| IV.1 | RAI3 als potentieller Tumormarker | 74 |
| IV.1.1 | Monoklonale anti-RAI3 Antikörper | 74 |
| IV.1.2 | Diagnostische Relevanz von RAI3..... | 77 |
| IV.2 | fAChR als neues Zielantigen für Immuntoxine | 79 |
| IV.2.1 | Herstellung und <i>in vitro</i> Charakterisierung des anti-fAChR Immuntoxins | 79 |
| IV.2.2 | Therapeutische Anwendung des scFv35-ETA' | 82 |
| IV.3 | Ausblick | 83 |
| IV.3.1 | Monoklonale Antikörper gegen RAI3 | 83 |
| IV.3.2 | Immuntoxine gegen fAChR..... | 84 |
| V | ZUSAMMENFASSUNG | 86 |
| VI | LITERATURVERZEICHNIS | 88 |
| VII | ANHANG | I |

| | | |
|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------|
| VII.1 | Abkürzungsverzeichnis | i |
| VII.2 | Vektorkarten | iii |
| VII.3 | Primersequenzen | iv |
| VII.4 | RAI3 Aminosäuresequenz | v |
| VII.5 | Abbildungsverzeichnis | v |
| VERÖFFENTLICHUNGEN | | VII |
| Publikationen | | vii |
| Posterpräsentationen | | vii |
| DANKSAGUNG | | VIII |

I EINLEITUNG

I.1 Tumorassoziierte Antigene und deren Bedeutung

Weltweit erkranken jährlich mehr als elf Millionen Menschen an Krebs. Mit 7,4 Millionen krebisbedingten Todesfällen jährlich ist es hinter Herz- und Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache weltweit und die Tendenz steigt weiter an [1]. Die Pharmaindustrie steht vor der großen Aufgabe, geeignete und erfolgversprechende Krebstherapien zu entwickeln. Bisherige Ansätze wie Operation, Chemotherapie und Bestrahlung zeigen zwar ihre Wirksamkeit, jedoch sind sie durch die zum Teil sehr starken Nebenwirkungen in ihrer erfolgreichen Anwendung limitiert. Vor allem die Chemotherapie, die weit verbreitet zur Krebsbekämpfung eingesetzt wird, birgt aufgrund ihrer unspezifischen Wirkung auf schnell proliferierende Zellen ein hohes Potential an unerwünschten Nebenwirkungen. So werden auch andere Körperzellen, die eine hohe Zellerneuerungsrate haben, wie z.B. Zellen der Haarfollikel, des Darmepithels und des Immunsystems durch die meisten dieser Medikamente stark angegriffen [2]. Ein Ziel der heutigen Krebsforschung ist es daher, Strukturen zu identifizieren, die die zielgerichtete Verabreichung von Wirkstoffen und Abtötung von Krebszellen ermöglicht, ohne normale Körperzellen zu schädigen. Ebenso ist die Verbesserung der Krebsdiagnostik und Prognostik ein wichtiger Baustein, der eine verbesserte Einschätzung eines Therapieerfolges ermöglichen kann. Aufgrund ihrer hohen Spezifität sind Antikörper optimale Vehikel zur zielgerichteten Therapie und eignen sich auch besonders zum diagnostischen Einsatz [3]. Da sich Krebszellen und normale Körperzellen sehr ähnlich sind, ist es eine große Herausforderung, spezifische Unterschiede und damit mögliche krebspezifische Zielstrukturen oder tumorassoziierte Antigene zu identifizieren. Die Nutzung jener Antigene oder auch „Targets“ zur spezifischen Verabreichung von Wirkstoffen wurde bereits vor 100 Jahren von Paul Ehrlich als das „Magic bullet“-Prinzip beschrieben [4]. Um mögliche Nebenwirkungen einer Antikörper-basierten Therapie möglichst gering zu halten, ist eine möglichst hohe Expression des Antigens auf Tumorzellen bei einer möglichst niedrigen Expression auf normalen Körperzellen eine der wichtigsten Voraussetzungen. Zur Identifizierung jener Zielantigene wird eine Vielzahl unterschiedlicher Analysemethoden eingesetzt. Basierend auf Zell- und Gewebematerial aus Zellbanken und Tumorbiopsien können mit „Microarrays“ Expressionsprofile erstellt werden und dadurch Unterschiede zwischen Tumorzellen und komplementären normalen Zellen auf mRNA Ebene identifiziert werden. Allerdings kommt es nur in 20% der Fälle zu einer Übereinstimmung des mRNA Profils mit der tatsächlichen Proteinexpression. Daher sind zusätzliche Expressionsanalysen auf Proteinebene zur Targetidentifizierung nötig. Mittels

targetspezifischer Antikörper kann die Proteinexpression potentieller Antigene an Tumormaterial in immunhistochemischen Analysen, wie dem „Tissue microarray“ (TMA) untersucht werden und nähere Informationen zum tatsächlichen Expressionsprofil gewonnen werden. Neben der Tumorspezifität eines Antigens sind auch die Expression and der Zelloberfläche und ein hohes Expressionslevel wichtige Kriterien, die für die Entwicklung von Antikörper-basierten Therapien essentiell sind. Durchflusszytometrische Analysen können hierüber genauere Auskunft geben [5]. Je nachdem welche Strategie mittels der Antikörper-basierten Therapie angestrebt wird, sind die Antigenfunktion und das Internalisierungsverhalten ausschlaggebend. Soll die Funktion des Antigens durch die Antikörperbindung beeinflusst werden, so werden in der Regel Rezeptoren ausgewählt, die eine entscheidende Funktion für die Zellproliferation haben, um somit möglicherweise dessen Funktion zu inhibieren. Ein Beispiel hierfür ist der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR). Der Antikörper Cetuximab wird unter dem Handelsnamen Erbitux® erfolgreich zur Inhibition des EGFR bei Darmkrebs eingesetzt [6]. Für eine spezifische Verabreichung toxischer Wirkstoffe können chemisch gekoppelte oder rekombinante Antikörper sowie andere Bindemoleküle eingesetzt werden. Hierbei ist vor allem die Internalisierung des Rezeptors nach Bindung ein entscheidendes Kriterium bei der Auswahl eines geeigneten Zielantigens, um den Wirkstoff ins Innere der Zelle zu transportieren. Gemtuzumab Ozogamizin (Mylotarg®) ist ein chemisch gekoppeltes Immunkonjugat, welches gegen das internalisierende Antigen CD33 gerichtet ist und in den USA für die Therapie der akuten myeloischen Leukämie (AML) zugelassen ist. Es setzt sich aus einem CD33-spezifischen Antikörper und dem bakteriellen Toxin Calicheamicin zusammen. CD33 wird bei 85 bis 90% der AML Patienten auf myeloischen Blasten exprimiert und wird nach Bindung internalisiert. Daher ist es ein geeignetes Zielantigen für eine Immuntherapie mit einem Toxin-gekoppelten Antikörper [7, 8]. Die Identifizierung und Validierung weiterer tumorassoziierter Antigene gehören in Kombination mit der Antikörpertechnologie zu den wichtigsten Schritten zur Verbesserung der Krebstherapie und -diagnose.

I.2 Antikörper und rekombinante Antikörperfragmente

Für die Realisierung des „magic bullet“-Prinzips ist neben der Identifizierung geeigneter Zielstrukturen auch die Entwicklung von spezifischen Bindemolekülen notwendig. Hierzu eignen sich die natürlichen Liganden der Rezeptoren vor allem Antagonisten zur Inaktivierung eines Rezeptors. Diese sind jedoch nicht in allen Fällen bekannt („orphan Receptors“) oder biotechnologisch schwer herzustellen bzw. zu gewinnen. Eine vielversprechende Alternative zum Einsatz natürlicher Liganden sind monoklonale Antikörper (mAk) oder Antikörper-basierte Moleküle. Antikörper sind die zentralen Moleküle der

humoralen Immunantwort. Sie bestehen aus zwei identischen leichten Ketten mit einem Molekulargewicht von jeweils ca. 25 kDa und zwei identischen schweren Ketten mit einem Molekulargewicht von jeweils ca. 50 kDa, die über intermolekulare Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und insgesamt eine Y-förmige dreidimensionale Struktur bilden (Abbildung I-1 A). Die leichte Kette lässt sich zudem weiter unterteilen in eine N-terminale variable Domäne (V_L) und eine C-terminale konstante Domäne (C_L). Ähnliches gilt auch für die schwere Kette. Auch hier gibt es eine N-terminale variable Domäne (V_H). Allerdings unterscheidet man hier je nach Ig Isotyp zwischen mindestens drei N-terminalen konstanten Domänen (C_{H1-3}). Durch die Zusammenlagerung von V_L und V_H kommt es zur Ausbildung der spezifischen Antigenbindestelle, dem Paratop. Die Spezifität der Antikörper wird durch die variablen Domänen bestimmt. Hier differenziert man zwischen jeweils drei hypervariablen Regionen, auch „complementarity-determining regions“ (CDRs) genannt, und jeweils vier konservierten „framework“-Regionen mit ausgeprägter β -Faltblattstruktur. Innerhalb dieser dreidimensionalen Strukturen der V_H und V_L kommt es durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zur spezifischen Bindung zwischen Antigen und Antikörper. Die gebundene Stelle am Antigen wird dabei als Epitop bezeichnet. Der C-Terminus ist nicht an der Antigenbindung beteiligt und erfüllt Effektorfunktionen, wie Komplementaktivierung oder Induktion der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC). Neben Vollängenantikörpern werden auch verschiedene Varianten der Antikörperfragmente für diagnostische oder therapeutische Zwecke eingesetzt. Dabei sind vor allem die Fab-Fragmente, die aus den variablen Regionen der leichten und der schweren Kette sowie der C_{H1} und C_L Regionen bestehen und „single chain“-Fragmente der variablen Regionen (scFv) hervorzuheben (Abbildung I-1 B, C). ScFvs bestehen nur aus der V_L und V_H und beinhalten damit die volle Antigenbindestelle. Da sie jedoch nicht über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind, werden sie in der Regel durch einen Peptidlinker rekombinant verbunden.

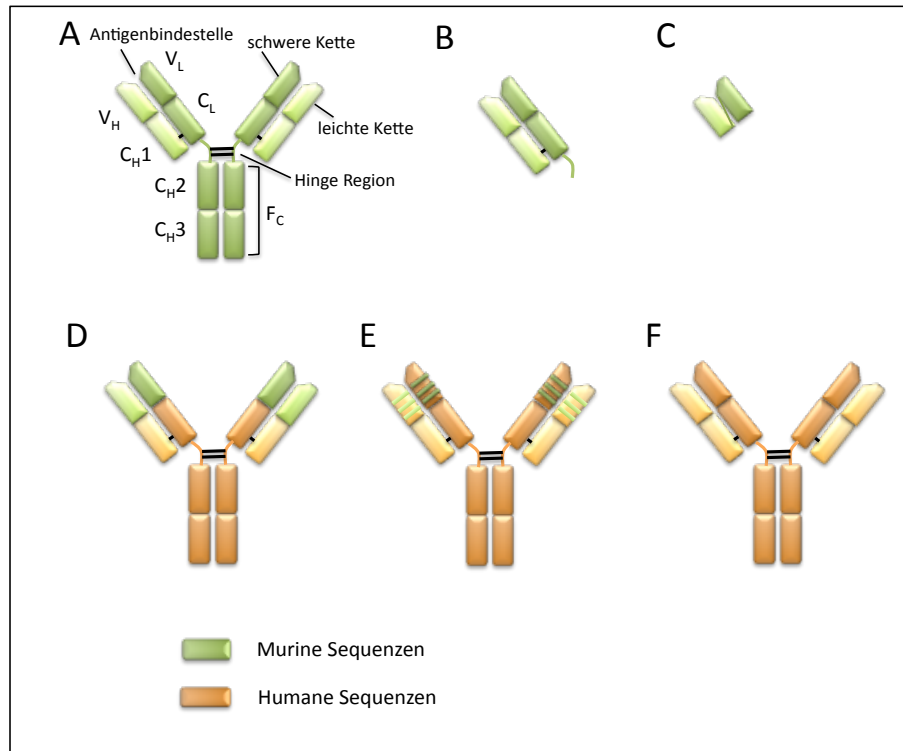


Abbildung I-1 Varianten der gängigen Antikörper und Antikörperfragmente.

A: muriner IgG Antikörper, B: Fab-Fragment; C: scFv; D: chimerer Antikörper; E: humanisierter Antikörper; F: humaner Antikörper. (Abbildung nach Allen, 2002 [9])

Antikörper eignen sich aufgrund ihrer hohen Spezifität besonders gut für zielgerichtete Therapien und diagnostische Anwendungen. Die Entwicklung breit gefächelter molekularbiologischer und biotechnologischer Strategien ermöglicht die Generierung von Antikörpern und Antikörperfragmenten für nahezu jedes beliebige Antigen. Zu den wichtigsten Methoden zählen die Hybridomatechnologie sowie das „Phage Display“-Verfahren. Die Hybridomatechnologie wurde im Jahr 1975 von Köhler und Milstein entwickelt und ist heute immer noch eine der wichtigsten Standardmethoden zur Generierung von mAk [10]. Die Methode beruht auf der effektiven Fusion primärer B-Lymphozyten mit einer Myelomzelllinie. Primäre B-Zellen haben in Kultur nur eine begrenzte Lebensdauer, was eine effiziente Produktion von Antikörpern *in vitro* erheblich einschränkt. Durch die Fusion werden die kontinuierlichen Wachstumseigenschaften der Krebszellen genutzt und auf die generierte Hybridomazelle übertragen. Die so gewonnenen Hybridomazellen sekretieren ein Gemisch an Antikörpern mit unterschiedlichen Paratopen und Spezifitäten basierend auf ihrem B-Zell Ursprung (polyklonal). Erst die Vereinzelung der Zellen ermöglicht die Herstellung von mAks. Durch Immunisierung von Mäusen mit dem gewünschten Antigen und anschließender Hybridomafusion lassen sich hochspezifische mAks gegen eine Vielzahl von Antigenen generieren. Murine Antikörper haben bei therapeutischem Einsatz im Menschen jedoch zwei entscheidende Nachteile. Zum Einen induzieren Sie aufgrund ihres murinen Ursprungs eine

unerwünschte „human-anti-Maus-Antikörper“ (HAMA) Immunreaktion, die zur Ausbildung von Immunkomplexen und zur Neutralisation des mAk führen kann. Zum Anderen ist der murine Fc Teil des Antikörpers nur eingeschränkt in der Lage, Effektorzellen des humanen Immunsystems zu aktivieren. Aus diesen Gründen wurden verschiedene Ansätze zur Generierung chimärer, humanisierter sowie vollkommen humaner Antikörper entwickelt (Abbildung I-1 D, E, F). Chimere Antikörper bestehen aus den murinen V-Regionen und den humanen konstanten Domänen. Eine Humanisierung muriner Antikörper kann durch einen Transfer der murinen CDR Regionen in ein humanes „Framework“ erreicht werden (CDR-„Grafting“) [11]. Allerdings gewinnen die Technologien zur Herstellung vollkommen humaner Antikörper eine immer größere Bedeutung bei der Entwicklung neuer therapeutischer Antikörper, da sie eine schnellere klinische Entwicklung ermöglichen als das aufwendige Verfahren zur Humanisierung. Humane Antikörper können durch zwei verschiedene Technologien generiert werden. Zum Einen bietet die Immunisierung transgener Mäuse in Kombination mit der etablierten Hybridomatechnologie, zum Anderen das „Phage Display“-Verfahren die Möglichkeit, humane Antikörper zu selektieren [12, 13]. Das „Phage Display“ basiert auf der Präsentation von Antikörperfragmenten im Fab oder scFv-Format in Fusion mit Hüllproteinen filamentöser Phagen auf der Phagenoberfläche. Durch zyklische Selektions- und Amplifikationsrunden, dem sogenannten „Panning“ können diejenigen Phagen isoliert werden, die ein antigenspezifisches Fusionsprotein präsentieren. Ein besonderer Vorteil liegt darin, dass das Protein über den Phagen direkt mit der entsprechenden genetischen Information verknüpft vorliegt und in einem Schritt zusammen isoliert werden kann. Für die Herstellung humaner Antikörper werden in der Regel synthetische Bibliotheken mit einer Vielzahl von scFv oder Fab Sequenzen, die auf humanen „Framework“ Sequenzen beruhen und hohe Diversitäten in den Antigenbinderegionen aufweisen, eingesetzt. Diese Methode eignet sich jedoch ebenfalls zur Selektion von Antikörpern aus isolierten Lymphomzellen von Patienten und bietet damit die Möglichkeit humane krankheitsspezifische Antikörper zu gewinnen [12, 14, 15].

I.3 Immuntoxine

Basierend auf dem „magic bullet“-Konzept von Paul Ehrlich stellen Immuntoxine die heutige Umsetzung einer zielgerichteten Verabreichung von Wirkstoffen an die Zielzelle dar. Sie spielen vor allem bei der Entwicklung neuer, verbesserter Krebstherapeutika nach wie vor eine bedeutende Rolle und viele derartige Moleküle befinden sich in der klinischen Entwicklung [16]. Sie bestehen in der Regel aus einem Antikörper oder Antikörperfragment als spezifische Bindedomäne und einer toxischen Komponente. Aber auch natürliche Liganden wie Wachstumsfaktoren wurden bereits als Bindedomäne in Immuntoxinen, auch

unter dem Namen chimere Toxine, eingesetzt. Die Entwicklung von Immuntoxinen begann bereits in den frühen 80er Jahren [17]. Diese Immuntoxine der ersten Generation bestehen aus Volllängenantikörpern, die chemisch an ein bakterielles oder pflanzliches Toxin gekoppelt werden. Weiterführende Ansätze beinhalten die Deletion der ursprünglichen Bindedomäne der Toxine, um somit eine höhere Spezifität zu erreichen. Immuntoxine der zweiten Generation sind rekombinante Fusionsproteine, die eine chemische Kopplungsreaktion mit den damit verbundenen Nachteilen wie die Heterogenität der Probe überflüssig machen [18]. Die am häufigsten eingesetzten Toxine sind neben den pflanzlichen Toxinen wie Ricin oder Saporin vor allem bakterielle Toxine wie das Diphtherietoxin (DT) und Exotoxin A aus *Pseudomonas aeruginosa* (ETA) [19]. Bei den pflanzlichen Toxinen unterscheidet man zwischen zwei Familien der ribosomeninaktivierenden Proteine (RIP) Klasse I und II. Klasse I RIP, zu der Saporin gehört, bestehen nur aus einer katalytisch aktiven Domäne wohingegen Toxine der Klasse II RIP, zu der Ricin gehört, zusätzlich eine Bindedomäne beinhaltet. Bei der Entwicklung rekombinanter Immuntoxine, spielen die bakteriellen Toxine jedoch eine viel größere Rolle. Sie lassen sich leichter rekombinant herstellen und besitzen zusätzliche Eigenschaften, wie eine definierte Translokationsdomäne sowie Furin-Schnittstelle, die sie für eine Anwendung als Immuntoxin besonders auszeichnen. Am Beispiel des ETA werden diese Eigenschaften und Wirkungsweisen im Folgenden näher erläutert, treffen jedoch im Wesentlichen auch auf das DT zu. ETA ist ein bakterielles Toxin mit 613 Aminosäuren aus *P. aeruginosa* bestehend aus drei funktionalen Domänen [20]. Die Domäne Ia ist die natürliche CD91(α 2-Makroglobulinrezeptor)-Bindedomäne. Domäne II ist die Translokationsdomäne zur Translokation ins Zytosol, die zusätzlich ein Furin-spaltmotiv zur intrazellulären Spaltung enthält. Domäne III ist die eigentliche toxische Domäne mit Adenosindiphosphat(ADP)-ribolysierender Enzymfunktion zur Inhibierung des eukaryotischen Elongationsfaktors 2 (eEF2) [21]. Getrennt werden Domäne II und III durch Domäne Ib, dessen genaue Funktion bisher nicht bekannt ist [22]. Bei Einsatz als Immuntoxin wird die natürliche Bindedomäne Ia deletiert (ETA') und durch eine tumorspezifische Bindedomäne wie einem Antikörperfragment ausgetauscht, um eine spezifische Bindung des Fusionsproteins zu gewährleisten. Der Prozess der Intoxifizierung durch ein ETA'-basiertes Immuntoxin lässt sich wie folgt zusammenfassen. Bereits im Medium bzw. im Plasma wird die C-terminale Aminosäure Lysin durch Carboxypeptidasen abgespalten [23]. Bindet das Immuntoxin an eine Zelle, wird es über rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen und so zum *trans*-Golgi-Netzwerk transportiert. Im Endosom spaltet die Serinendoprotease Furin innerhalb der Domäne II und die verbindende Disulfidbrücke wird reduziert [24-26]. Über die C-terminale Signalsequenz (REDL) wird der Transport zum Endoplasmatischen Retikulum induziert [27]. Anschließend erfolgt die Translokation ins Zytosol über die verbleibende Domäne II sowie die Inhibierung der

Proteinsynthese über die Inaktivierung des eEF2 und damit die Tötung der Zelle über Apoptose [28, 29]. Zahlreiche Immuntoxine mit Spezifität für verschiedene Erkrankungen wurden entwickelt und befinden sich aktuell in präklinischer und klinischer Forschung [16, 30]. Ein erfolgreiches Beispiel ist das ETA-basierte Immuntoxin Proxinium (VB4-845) der Firma Viventia, das gegen das Zelladhäsionsmolekül EpCAM gerichtet ist. Es befindet sich in Phase II/III der klinischen Entwicklung und zeigte bei der Behandlung des Hals-Kopf-Karzinoms bereits erste Erfolge [31, 32]. Das erste von der Food and Drug Administration (FDA) zugelassene rekombinante Immuntoxin ist Ontak, auch als Denileukin Diftitox bekannt. Dieses Immuntoxin besteht aus Interleukin-2 in Fusion mit DT und wird bei der Behandlung des kutanen T-Zell Lymphoms erfolgreich eingesetzt [33]. Auch wenn bisher nur wenige Immuntoxine zugelassen bzw. in der klinischen Entwicklung weit fortgeschritten sind, zeigt die Vielfalt der aktuell untersuchten Moleküle doch, welch großes Potential nach wie vor in dem Konzept Immuntoxin steckt.

I.4 RAI3 als neues Tumorantigen

I.4.1 Vorkommen, Struktur und Funktion

Bei der Identifizierung weiterer möglicher Zielstrukturen spielen vor allem G-Proteingekoppelte Rezeptoren (GPCRs) eine große Rolle. Der „Retionic acid inducible Receptor“ 3 (RAI3) ist ein Mitglied dieser Rezeptorfamilie, die mit über 1000 Molekülen die größte und vielfältigste Familie dieser Art darstellt. GPCRs zeichnen sich durch ihre charakteristische Struktur aus einer N-terminalen, extrazellulären Ligandbindedomäne, sieben α -helikalen Transmembrandomänen und einer intrazellulären C-terminalen Domäne aus [34]. Dabei steht der C-Terminus in Wechselwirkung mit G-Proteinen, die ihrerseits in der Lage sind, Guaninnukleotide (GDP, GTP) zu binden (Abbildung I-2). Bei Bindung eines Agonisten kommt es über das G-Protein zur Aktivierung einer Vielzahl von „Down-Stream“ Effektormolekülen wie z.B. Adenylzyklasen und Phospholipasen, die ihrerseits zur Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden führen [35]. Auf diese Weise sind GPCRs in der Regulation wichtiger physiologischer und pathologischer Prozesse wie Zellproliferation und Differenzierung beteiligt. Diese Mechanismen können wiederum bedeutsam für eine Vielzahl von Erkrankungen wie z.B. Diabetes Typ 2 [36], Herzversagen [37] und Krebserkrankungen [34] sein. Aus diesem Grund werden GPCRs als besonders wichtige pharmazeutische Zielproteine angesehen [38, 39]. Bereits heute sind bis zu 50% der Medikamente in klinischer Entwicklung gegen GPCRs gerichtet [38]. Weiterhin werden diese Rezeptoren in der Regel auf der Zelloberfläche exprimiert und zeigen eine schnelle Rezeptorinternalisierung [40], was sie zu geeigneten Targets für Antikörper-basierte

Therapien macht [34, 40]. Hier gilt es, Rezeptoren zu identifizieren, die ein deutlich verändertes Expressionsprofil bei Tumorzellen zeigen. RAI3, auch bekannt als GPRC5A und RAIG-1 ist ein möglicher Kandidat hierfür.

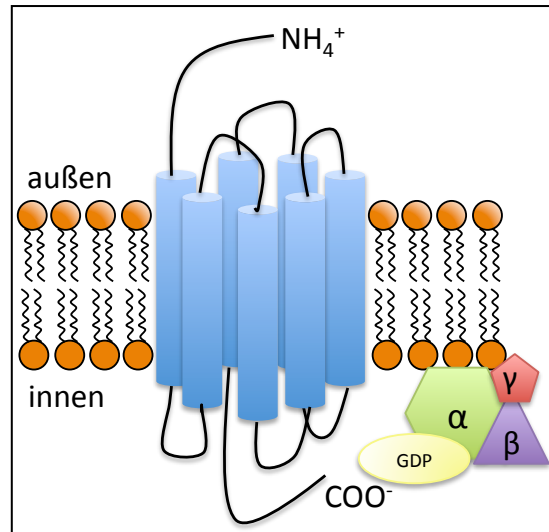


Abbildung I-2 Schematische Darstellung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors.

Die sieben Transmembrandomänen (blau) durchspannen die Membran und bilden extrazelluläre und intrazelluläre Schleifen. Dabei ist das N-terminale Ende nach außen und das C-terminale Ende nach innen gerichtet. Dieses steht in Kontakt zu einem G-Protein bestehend aus α , β und γ -Untereinheiten. Das G-Protein bindet das Guanosindiphosphat (GDP). (Abbildung nach Ji *et al.*, 1998 [41])

RAI3, dessen Ligand bisher unbekannt ist („orphan“ GPCR) wurde ursprünglich als *trans*-Retinolsäure induzierbares Gen identifiziert [42]. Der korrespondierende Rezeptor ist sowohl an der Zelloberfläche als auch in intrazellulären Vesikeln lokalisiert und wird hauptsächlich in normalem Lungengewebe exprimiert. In anderen Geweben wie Leber, Kolon, Pankreas und Brustdrüsen konnte hingegen nur ein sehr niedriges Expressionslevel detektiert werden [42-44]. Es wird angenommen, dass RAI3 eine besondere Rolle bei der Regulation des Zellwachstums hat, jedoch konnte dies noch nicht endgültig aufgeklärt werden und wird zurzeit in der Literatur kontrovers diskutiert [44-47]. Ursprünglich wurde RAI3 aufgrund der angenommenen Regulation durch Retinolsäure eine Tumorsuppressorfunktion zugeschrieben. Retinolsäuren sind sowohl synthetische als auch natürliche Vitamin A Analoga, die bereits signifikante Effekte auf Wachstum, Differenzierung, Apoptose und Tumorgenese von Zellen sowie positive therapeutische Effekte bei bestimmten Krebsarten gezeigt haben [43]. Diese Annahme wurde unterstützt durch eine Untersuchung von „knock-out“ Mäusen, die eine deutlich höhere Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung von Lungentumoren im Alter von ein bis zwei Jahren zeigten als Wildtyp-Mäuse [47]. Weiterhin konnte in RT-PCR Analysen verschiedener Lungentumore ein erhöhtes mRNA Level im Normalgewebe im Vergleich zum angrenzenden Tumorgewebe detektiert werden. Andere Untersuchungen jedoch zeigten gegenteilige Ergebnisse und sprechen RAI3 eher einen

onkogenen, wachstumsfördernden Charakter zu. So konnte in einer Zelltransfektionsanalyse der Nthy Zelllinie (Follikuläres Schilddrüsenkarzinom) die Induktion von Apoptose durch Transfektion mit RAI3 nachgewiesen werden [45]. Durch weitere Untersuchungen und der Detektion eines Expressionsmaximums in der G1-Phase des Zellzyklus bei HeLa Zellen (Epithelzellen des Zervixkarzinoms) wird angenommen, dass RAI3 aktiv an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist [46]. Vor allem beim Mammakarzinom konnten zahlreiche Hinweise für eine onkogene Bedeutung des Rezeptors RAI3 identifiziert werden.

I.4.2 Bedeutung von RAI3 beim Mammakarzinom

Brustkrebs ist weltweit eine der häufigsten Krebserkrankungen mit jährlich rund 1,3 Millionen diagnostizierten Neuerkrankungen und rund einer halben Million Todesfällen [1]. In Deutschland ist es die häufigste Krebserkrankung bei Frauen und macht hier circa 28% aller Krebsneuerkrankungen aus [48]. Insgesamt liegt die fünf-Jahres Überlebensrate bei etwa 81% [49]. Allerdings erfahren etwa ein Drittel der Patienten ein Wiederkehren der Erkrankung, das dann bis auf wenige Ausnahmen nicht mehr heilbar ist [50, 51]. Man unterscheidet bei Brustkrebs zwischen *in situ* und invasiven Formen. *In situ* werden diejenigen Brustkrebsarten genannt, die nur auf die Drüsengänge (duktales Karzinom *in situ*) oder die Drüsenlappen der Brust (lobuläres Karzinom *in situ*) beschränkt sind. Invasive Formen haben diese Bereiche bereits durchbrochen und infiltrieren das umliegende Brustgewebe. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um das invasive duktales Karzinom. Zur Standardtherapie zählt meist die Operation, bei der die Brust ganz (Mastektomie) oder teilweise entfernt wird (Lumpektomie). Im Anschluss folgt in der Regel eine Bestrahlung. Die Chemotherapie kommt vor allem bei metastatisiertem Mammakarzinom zum Einsatz, wobei verschiedene Chemotherapeutika zur Verfügung stehen [49]. Eine wichtige Erweiterung der Krebstherapie bei Brustkrebs ist der Einsatz der Hormontherapie mittels Tamoxifen. Dieses kann bei Östrogenrezeptor-positivem Brustkrebs als Inhibitor des Östrogenrezeptors eingesetzt werden [52]. Seit 2006 ist der humanisierte, mAk Trastuzumab unter dem Handelsnamen Herceptin® von der FDA zur Behandlung des Mammakarzinoms zugelassen. Dieser therapeutische Antikörper ist spezifisch für die extrazelluläre Domäne von Her2 (auch Her2/neu oder erbB2), eine transmembrane Rezeptor-Tyrosinkinase der Her-Familie zu der auch der EGFR gehört [53]. Eine erhöhte Expression von Her2 wird in 15-30% der diagnostizierten Mammakarzinome detektiert und korrespondiert mit schnellerem Tumorwachstum und einer höheren Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs [54-56]. Der Her2 Expressionsstatus wird daher auch als einer der wichtigsten prognostischen Faktoren gewertet. Durch die Erweiterung des Therapiespektrums konnte das Risiko für ein Wiederkehren des Tumors bei Her2-positiven Tumoren in frühen Stadien

um 52% und für den Tod um 33% reduziert werden [57]. Allerdings zeigen insgesamt nur ein Drittel der behandelten Patienten bei alleiniger Verabreichung von Trastuzumab überhaupt ein Ansprechen auf die Therapie [56] und die meisten Patienten entwickeln innerhalb eines Jahres eine Resistenz während der Therapie [58, 59]. Die Entdeckung neuer prognostischer Marker und möglicher therapeutischer Antigene ist daher nach wie vor von besonderem Interesse. RAI3 könnte ein möglicher Kandidat dafür sein.

RAI3 scheint vor allem beim Mammakarzinom eine besondere Rolle einzunehmen. In einer cDNA „Microarray“ Untersuchung wurde eine erhöhte Expression von RAI3 in Brustkrebsproben festgestellt [60]. In einer weiteren Studie wurde in sechs von elf Brustkrebszelllinien und in 19 von 25 Brustkrebsgewebeproben eine erhöhte RAI3 Expression im Vergleich zum jeweiligen Normalgewebe festgestellt. Ein weiterer bedeutender Hinweis auf eine wachstumsfördernde Rolle von RAI3 gab eine siRNA Untersuchung, die eine deutliche Reduktion des Zellwachstums in Brustkrebszelllinien ergab [44]. In einer vergleichenden Untersuchung der *RAI3* Genexpression von normalen Brustepithelzellen und den entsprechenden Krebszelllinien wurde eine negative Korrelation zwischen p53 und RAI3 identifiziert [46]. In natürlichen Geweben wird die Expression von RAI3 durch p53 unterdrückt. In Tumorzellen wird das Tumorsuppressorgen *p53* z.B. durch Mutation inaktiviert, und es kommt zur Überexpression von RAI3 und zur Proliferation der Zelle. Diese Ergebnisse verdeutlichen die besondere Bedeutung von RAI3 bei der Tumortransformation und beim Tumorwachstum. Aus diesem Grund und basierend auf einer anzunehmenden Expression auf der Zelloberfläche könnte RAI3 ein möglicher neuer prognostischer Marker oder sogar ein neues Target für Antikörper-basierte Therapien werden.

I.5 Der fetale Acetylcholin Rezeptor als neues Tumorantigen

I.5.1 Vorkommen, Struktur und Funktion

Der fetale Acetylcholin Rezeptor (fAChR) ist die fetale Vorläuferform des nikotinischen muskulären AChR. Der AChR ist ein Ionenkanal bestehend aus fünf Untereinheiten (Abbildung I-3). Die beiden Isoformen unterscheiden sich durch den Austausch der γ -Untereinheit in der fetalen Form durch die ϵ -Untereinheit in der adulten Form. Somit ergibt sich die Zusammensetzung $\alpha\beta\gamma\delta$ für die fetale Form und $\alpha\beta\epsilon\delta$ für die adulte Form [61]. Im embryonalen Muskel wird vorzugsweise die fetale Form des Rezeptors exprimiert [62]. Der Austausch erfolgt im Bereich der neuromuskulären Endplatten während der embryonalen Muskelentwicklung durch Genrepression der γ -Untereinheit und Induktion des Gens der ϵ -Untereinheit [63, 64]. Bei einer normalen Entwicklung des Fötus kommt die adulte Form des

Rezeptors nach der Geburt in nahezu allen mit Nerven verbundenen Muskeln vor. Dort sind sie erheblich an der Signalübertragung an den Muskelendplatten verantwortlich. Bei Freisetzung des Neurotransmitters Acetylcholin an den Synapsen, kommt es zu Konformationsänderungen der Acetylcholinrezeptoren und es öffnen sich die Ionenkanäle. Diese transportieren sowohl Kalzium, Kalium als auch Natriumionen. Durch den Ionenstrom kommt es zu einer Depolarisierung der Muskelzelle. Bei Überschreiten eines Schwellenpotentials entsteht ein Aktionspotential, das wiederum zur Kontraktion des Muskels führt [65]. Die Expression der fetalen Form des AChR ist nach der Geburt auf wenige Gewebe limitiert. So konnte er nur noch an Zellen des äußeren Augenmuskels mit unbekannter Funktion [66] und an Myoidzellen des Thymus [67] nachgewiesen werden. Eine Re-Induktion der Expression des fAChR konnte bei Durchtrennung der Nervenverbindung zu den Muskelfasern detektiert werden [63]. Im Gegensatz dazu wurde eine stark erhöhte Expression des fAChRs beim Rhabdomyosarkom detektiert.

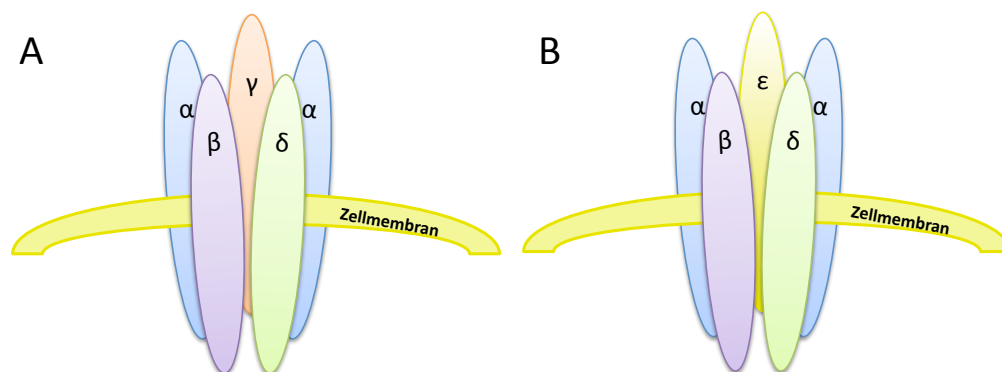


Abbildung I-3 Fetale und adulte Form des Acetylcholinrezeptors

Die Isoformen des Acetylcholinrezeptors bestehen aus jeweils fünf Untereinheiten. Sie unterscheiden sich lediglich durch den Austausch der γ -Untereinheit in der fetalen Form (A) durch die ϵ -Untereinheit in der adulten Form (B). (Abbildung nach Vincent, 2002 [68])

I.5.2 Bedeutung des fAChR beim Rhabdomyosarkom

Das Rhabdomyosarkom (RMS) ist die häufigste Weichgewebstumorerkrankung bei Kindern und weist eine skelettmuskelähnliche Struktur auf. Man unterscheidet im Wesentlichen zwischen den zwei häufigsten Subtypen des RMS, der embryonalen und der alveolären Form [69]. Die alveoläre Form, welche mit einer deutlich schlechteren Prognose einhergeht lässt sich in 70-80% durch chromosomale Translokationsereignisse charakterisieren. Die daraus resultierenden Fusionsprodukte *PAX3*(„Paired box“)-*FKHR*(„Forkhead related transcription factor“) oder *PAX7*-*FKHR* können durch PCR-Analysen identifiziert werden. Neben der Bedeutung für die Diagnose des alveolären Subtyps des RMS werden diesen Fusionen auch eine pathologische Relevanz zugeschrieben. Die bisherige Therapie des RMS sieht eine intensive Chemotherapie sowie je nach Stadium und Lokalisation des Tumor

auch eine Bestrahlung vor. Obwohl mittlerweile fünf-Jahres-Überlebensraten von über 70% für Patienten mit lokalem Tumor durch neue Therapieansätze erreicht werden, so sind doch vor allem bei metastatisiertem RMS die Prognosen deutlich schlechter und liegen bei nur 20 bis 30%. Vor allem Patienten älter als zehn Jahre mit Knochen- bzw. Knochenmarkmetastasen haben eine sehr schlechte Überlebensprognose von nur 5% [70, 71]. Nach wie vor ist die Entwicklung neuer Therapieansätze wie beispielsweise der Immuntherapie daher von großer Relevanz. Durch RT-PCR und immunhistochemische Analysen konnte die spezifische, stark erhöhte Expression des fAChR beim RMS gezeigt werden, welche auch eine differenzierte Unterscheidung des RMS von anderen Sarkomen im Kindesalter ermöglicht [72]. Diese nahezu exklusive Expression des fAChR beim RMS und die Expression an der Zelloberfläche macht den fAChR zu einer vielversprechenden möglichen neuen Zielstruktur für die Entwicklung Antikörper-basierter Therapien des RMS.

I.5.3 Der fAChR als Tumorantigen für andere Krebserkrankungen

Neben der erhöhten Expression des fAChR im RMS konnte auch eine erhöhte Expression des Rezeptors beim metastatisiertem Melanom detektiert werden. Hier scheint es insgesamt zu einer rhabdoiden Transdifferenzierung der Metastasen zu kommen, bei der auch andere muskuläre Marker exprimiert werden [73]. Aus diesem Grund könnte ein fAChR-spezifischer therapeutischer Ansatz ebenfalls für eine Therapie des metastasierten Melanoms von großer Bedeutung sein.

I.5.4 Antikörper gegen den Acetylcholinrezeptor

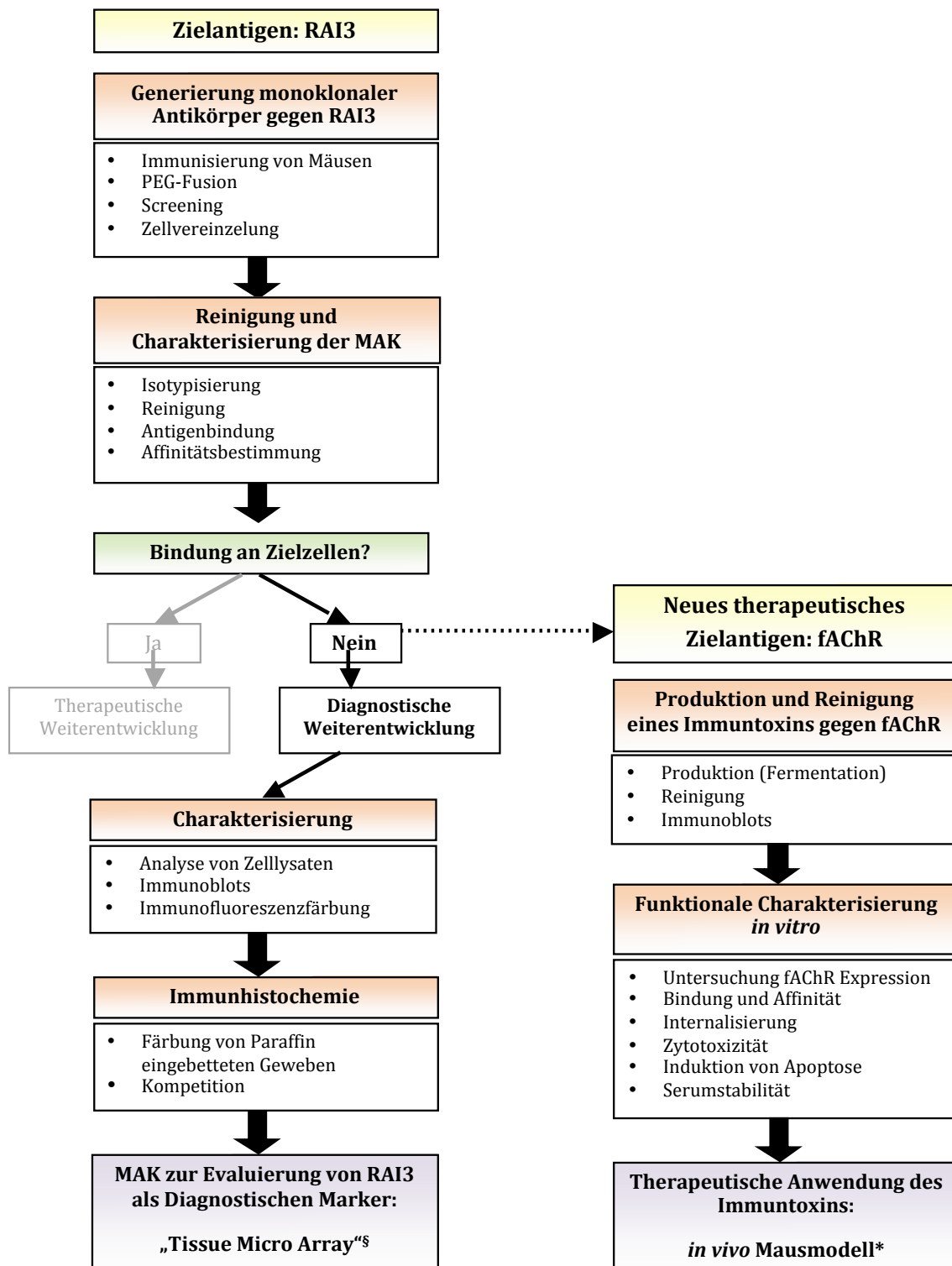
Myasthenia gravis (MG) ist eine seltene Autoimmunerkrankung, die sich durch eine schwere Muskelschwäche in Abhängigkeit der Belastung kennzeichnet. Das Immunsystem der Patienten bildet dabei unter Anderem Antikörper gegen den AChR. Durch deren Bindung kommt es zur Blockierung des Rezeptors, wodurch es zu einer Störung der Signalübertragung an den Synapsen kommt. Zusätzlich wird der Abbau des Rezeptors durch Quervernetzung über die Antikörper erhöht [74]. Eine Analyse der Epitope dieser Antikörper zeigte, dass diese sich hauptsächlich gegen die „main immunogenic region“ an der extrazellulären Domäne der α -Untereinheit des Rezeptors richten [75, 76]. Aber auch Antikörper gegen die γ -Untereinheit des fetalen AChR konnten vor allem bei Schwangerschaften von MG Patientinnen detektiert werden [77]. Durch kombinatorische cDNA Bibliotheken, die aus dem Thymus von MG Patienten generiert wurden, konnten bereits zahlreiche AChR-spezifische Fab-Fragmente isoliert und charakterisiert werden [77-80]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte auf den scFv35 zugegriffen werden, der auf einem dieser isolierten γ -Untereinheit-spezifischen Fab Fragmente beruht [80].

I.6 Ziele der Arbeit

MAk und Antikörper-basierte Proteine haben aufgrund ihrer hohen Spezifität nach wie vor einen besonders großen Stellenwert in der pharmazeutischen Krebsforschung. Die besondere Herausforderung zur Anwendung dieser Moleküle liegt in der Identifizierung geeigneter Zielstrukturen, die vielversprechende Kandidaten für eine Antikörper-basierte Therapie darstellen. Des Weiteren finden spezifische mAk auch einen breiten Einsatzbereich in der Diagnostik. Hier können Sie durch den routinemäßigen Einsatz in pathologischen Untersuchungen wertvolle Hinweise mit diagnostischer sowie prognostischer Relevanz liefern und somit auch zu einer verbesserten, individualisierten Therapieauswahl beitragen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten mAk gegen ein potentiell Tumorantigen RAI3 generiert und im Anschluss charakterisiert werden. Hierzu konnte im Rahmen einer Kooperation mit der Firma M-Fold Biotech (Tübingen) auf rekombinantes RAI3 zugegriffen werden, welches für die Immunisierung von Mäusen eingesetzt werden sollte. Mittels Hybridomatechnologie sollten dann Hybridzellen generiert werden, die RAI3-spezifische Antikörper sekretieren. Durch Vereinzelung positiver Zellen sollten dann mAk generiert werden, die daraufhin gereinigt und auf ihre Bindungseigenschaft untersucht werden. Dazu sind sowohl ELISA-basierte Methoden als auch Western Blots, Immunfluoreszenzfärbung sowie durchflusszytometrische Analysen vorgesehen. Abhängig von der Bindung der Antikörper an die Zelloberfläche ist die weiterführende Charakterisierung auf eine therapeutische Wirksamkeit oder die rein diagnostische Weiterentwicklung vorgesehen. Hierzu steht durch die Kooperation mit dem Uniklinikum Aachen eine Vielzahl von Paraffin-Gewebeschnitten zur Verfügung. Bei erfolgreicher Färbung der Schnitte sollte die Färbung und Auswertung eines TMAs erfolgen und dadurch wichtige Aufschlüsse über die tatsächliche Relevanz des Zielantigens gewonnen werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Produktion und funktionale Charakterisierung eines fAChR-spezifischen Immuntoxins durchgeführt werden. Durch die Kooperation mit der Uniklinik Würzburg steht dafür ein Konstrukt bestehend aus dem fAChR-spezifischen humanen scFv35 in genetischer Fusion mit ETA' zur Verfügung. Dieses sollte bakteriell in *Escherichia coli* exprimiert und daraus funktional isoliert und gereinigt werden. Im Anschluss sollte es mittels Durchflusszytometrie auf seine spezifischen Bindungseigenschaften, sowie Internalisierungsverhalten und Affinität untersucht werden. Daraufhin sollte die zytotoxische Wirkung *in vitro* und in einem ersten *in vivo* Mausmodell nachvollzogen werden. Abbildung I-4 zeigt eine Übersicht und den schematischen Ablauf dieser Arbeit.



§ Pathologische Auswertung TMA durch Dr. Nuran Bektas (Kooperation mit Institut für Pathologie, UK Aachen)
 *erstes Mausmodell durchgeführt durch Kooperationspartner Prof. Stefan Gattenlöhner (Institut für Pathologie, Uni Würzburg);
 erweiterte *in vivo* Versuche geplant im Anschluss an Doktorarbeit

Abbildung I-4 Übersicht Ablauf der Doktorarbeit.

II MATERIAL UND METHODEN

II.1 Material

II.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmittel

Alle verwendeten Chemikalien und Fertiglösungen wiesen wenigstens den Reinheitsgrad p.a. auf und wurden in der Regel von folgenden Firmen bezogen:

BD Biosciences (Heidelberg), Invitrogen (San Diego, USA), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen).

Die Verbrauchsmittel wurden in der Regel von folgenden Firmen bezogen:

Biozym (Oldendorf), BD Bioscience (Heidelberg), Eppendorf (Hamburg), Greiner Bio-One (Frickenhäusen), Invitrogen (San Diego, USA), Millipore (Eschborn), Pierce Biotechnology (Rockford, USA), Qiagen (Hilden), Schott (Mainz), Whatman (Bender & Hobheim, Bruchsal), Zeiss (Oberkochen).

II.1.2 Geräteliste

| | |
|-------------------------|--|
| Autoklaven: | Varioklav (H+P) 75S (Thermo Electron Corporation) |
| Eismaschine: | Icematic D201 (Castel Mac) |
| Elektrophorese: | Mini-SUB® Cell GT (Bio-Rad) für Agarosegele, Mini-Protean® 3 Cell (BioRad) für Protein-Gele, Mini Trans Blot® Cell (Bio-Rad) für Proteintransfer, Netzteil: Power Pac Basis/HC (Bio-Rad) |
| ELISA-Reader: | ELx808 (BioTek) |
| ELISA-Waschgerät: | Nunc-Immunowasher 12 (Nunc) |
| FACS: | FACSCalibur (Becton Dickinson) |
| FPLC: | ÄKTA FPLC (General Electric) |
| Heizblock: | QBT (Grant) |
| Hochdruckhomogenisator: | Microfluidizer M110L (Microfluidics) |
| Inkubatoren: | Function Line Typ UT12 (Heraeus), CB210 (Binder) |
| Lyophilie: | VDH Typ 2040 (Medizinische Geräte HJ Schrader) |
| Mikroskop: | Phasenkontrastmikroskop und Zubehör (Leica) |
| MilliQ-Anlage: | Membra-Pure Reinstwasseranlage, MemCap1 0,2µm PES |
| PCR-Thermocycler: | Primus 96 Plus (MWG-Biotech) |

| | |
|---------------------------|---|
| Pipetten/Pipettierhilfen: | Transferpette -8/-12 electronic (Brand), CellMate II Pipettus (Matrix), Pipetman Starter Kit (Gilson) |
| pH-Meter: | Basic Meter PB-11 (Satorius) |
| Photometer: | Biophotometer (Eppendorf) |
| Scanner: | HP Scanjet 4890 (Hewlett Packard) |
| Schüttel- und Mixgeräte: | Vortex-Genie 2 (Scientific Industries), Titramax 1000 für ELISA-Platten (Heidolph), Magnetrührer RCT basic (IKA), Thermomixer „comfort“ und „compact“ (Eppendorf), Multiflask-Shaker VKS75A (Edmund Bühler GmbH), CMV Überkopfrator, Innova TM 4430 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific), Intelli-Mixer RM 2L (LTF Labortechnik) |
| Sequenziermaschine: | ABI Prism 3730 Kapillar-Sequenzierer (Applied Biosystems) |
| Sterilbank: | Biowizard 2 MSC (Kojair) mit Gasprofi 2 (WLD-TEC), Herasafe Typ HS-9 (Heraeus) |
| Thermokonstanträume: | Krum-Schröder /Pfeiffer |
| UV-Transilluminator: | Wellenlängenlänge 302nm (Bio-Rad), Photodokumentation Gel Doc XR System (Bio-Rad) |
| Waagen: | Präzisions- und Analysewaagen der Reihe Talent: TE6101, TE64, TE31025, TE12000 (Satorius) |
| Wasserbad: | TW20 Wasserbad (Julabo) |
| Zellwascher: | Dade Serocent (Dade) |
| Zellzähler: | Casy1 (Schärfe System) |
| Zentrifugen: | Eppendorf-Tischzentrifuge 5415D und 5415R (Eppendorf), Multifuge 1S und 3S-R (Heraeus), Mikro-Zentrifuge (neoLab), Biofuge Primo R (Heraeus), PICO Fuge (Stratagene), Mikrozentrifuge AL (Roth), Rotilabo-Zentrifuge mit Butterfly-Rotor (Roth) |

II.1.3 Allgemeine Puffer und Medien

Die Standardlösungen, -puffer und -medien wurden nach Sambrook *et al.* (1996) oder Ausubel *et al.* (1995) mit milli-Q Wasser hergestellt [81, 82]. Die Zusammensetzung spezieller Lösungen und Puffer ist in den jeweiligen Methoden aufgeführt. Medien wurden durch Autoklavieren (25 min/121°C/1 bar) sterilisiert. Thermolabile Substanzen wurden separat angesetzt, sterilfiltriert (0,2 µm) und nach dem Autoklavieren zugesetzt. Zum Einstellen der pH-Werte wurde in der Regel 1 M HCl bzw. 1 M NaOH verwendet.

II.1.4 Medien und Antibiotika für die Kultivierung von Bakterien

Für die Kultivierung von Bakterien wurden folgende Medien verwendet.

LB-Medium, pH 7,0

| | |
|-------------|-------------|
| 1% (w/w) | Trypton |
| 0,5% (w/v) | Hefeextrakt |
| 1% (w/v) | NaCl |
| (1,5% (w/v) | Agar) |

TB-Medium, pH 7,4

| | |
|------------|-------------|
| 1,3% (w/v) | Trypton |
| 2,7% (w/v) | Hefeextrakt |
| 0,8% (w/v) | Glycerin |

SOC-Medium

| | |
|------------|-------------------|
| 2% (w/v) | Trypton |
| 0,5% (w/v) | Hefeextrakt |
| 10 mM | NaCl |
| 25 mM | KCl |
| 10 mM | MgCl ₂ |
| 10 mM | MgSO ₄ |
| 20 mM | Glukose |

II.1.5 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Für die Kultivierung und Selektion von den eingesetzten Zelllinien wurden folgende Medien und Zusätze verwendet und von den Herstellern Invitrogen, Biochrom AG, Sigma-Aldrich und Calbiochem bezogen.

R-10

| | |
|--|---------------------------|
| RPMI 1640 (Invitrogen) supplementiert mit: | |
| 10% (v/v) | Fötales Kälberserum (FKS) |
| 100 U/ml | Penicillin |
| 100 µg/ml | Streptomycin |

HAT-Medium

| | |
|--------------------------|-------------------|
| R-10 supplementiert mit: | |
| 10% (v/v) | FKS |
| 100µM | Hypoxanthin |
| 16 µM | Thymidin |
| 0,4 µM | Aminopterin |
| 80 U/ml | mIL-6 |
| 50 µM | β-Mercaptoethanol |

HT-Medium

HAT-Medium ohne Aminopterin

Zeozin-Selektionsmedium

| | |
|--------------------------|--------|
| R-10 supplementiert mit: | |
| 100 µg/ml | Zeozin |

II.1.6 Reaktionskits und Enzyme

Für die DNA und RNA Arbeiten wurden folgende Reaktionskits verwendet und nach Herstellerangaben eingesetzt:

Tabelle II-1 Übersicht eingesetzter Reaktionskits

| Kit | Firma | Verwendung |
|---|----------------|---|
| Nucleospin Plasmid | Macherey&Nagel | Plasmidpräparation im Mini Maßstab (bis 40 µg) |
| NucleoSpin Extract II | Macherey&Nagel | Extraktion von DNA aus Agarosegelen sowie Extraktion von DNA aus Agarosegelen |
| NucleoBond Xtra Maxi | Macherey&Nagel | Plasmidpräparation im Maxi Maßstab (bis 1 mg) |
| NucleoSpin RNA II | Macherey&Nagel | Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen |
| SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR | Invitrogen | cDNA Synthese |

Die Enzyme zur Restriktion, Ligation und Dephosphorylierung von DNA sowie die entsprechenden Puffer und Rinderserumalbumin (BSA)-Lösung wurden von New England Biolabs und Invitrogen bezogen. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Enzyme nach Herstellerangaben eingesetzt.

II.1.7 Antigene und Adjuvanz

Für die Immunisierung der BALB/c Mäuse wurde der GPCR RAI3 eingesetzt. Dieser wurde als Proteoliposom von der Firma M-Fold Biotech mit einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml geliefert. Zur Verstärkung der Immunreaktion wurde das Adjuvans GERBU Adjuvant MM (GERBU Biochemicals, Gaiberg) verwendet.

II.1.8 Antikörper

Zum Nachweis von Proteinen in ELISA (II.3.1), Western Blot (II.3.3), Durchflusszytometrie (II.3.5) und Immunofluoreszenzfärbung (II.3.6) kamen folgende Antikörper zum Einsatz.

Tabelle II-2 Übersicht verwendete Antikörper

WB: Western-Blot; DZ: Durchflusszytometrie; IF: Immunofluoreszenz

| Antikörper | Abkürzung | Firma | Anwendung |
|---|---------------------|--------------|------------------------------|
| Ziege anti-Maus IgG, Fc Region-HRPO | GAM ^{HRPO} | Sigma | Sekundärantikörper ELISA, WB |
| Ziege anti-Maus IgG, Fc Region-AP | GAM ^{AP} | Sigma | Sekundärantikörper WB |
| Ziege anti-Maus PE IgG (H+L) | GAM ^{PE} | Caltab | Sekundärantikörper DZ |
| Ziege anti-Maus Alexa Fluor 546 IgG (H+L) | A546 | Invitrogen | Sekundärantikörper IF |

| | | | |
|-------------------------------------|--------------------------------|---------|-------------------------|
| Anti-beta Actin-HRPO, monoklonal | β -Actin ^{HRPO} | Sigma | Ladekontrolle WB |
| Maus anti-penta His, monoklonal | α His | Sigma | Primärantikörper WB, DZ |
| Maus anti-penta-His Alexa Fluor 488 | aHA488 | Qiagen | Detektionsantikörper DZ |
| Maus anti-ETA (TC-1), monoclonal | TC-1 | FhG-IME | Primärantikörper WB, DZ |

II.1.9 Versuchstiere

Für die Immunisierungsversuche wurden sechs bis acht Wochen alte weibliche BALB/c Mäuse eingesetzt, die von der Firma Taconic, Dänemark bezogen wurden. Die durchgeführten Arbeiten wurden durch das LANUV NRW unter dem Aktenzeichen 10115A10a genehmigt.

II.1.10 Gewebeschnitte

Die verwendeten Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitte einzelner Gewebe wurden freundlicherweise vom Institut für Pathologie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Edgar Dahl des Uniklinikums Aachen zur Verfügung gestellt. Zur Expressionsanalyse von RAI3 im Mammakarzinom wurde auf einen bereits beschriebenen TMA der Universität Regensburg zurückgegriffen [83]. Dieser beinhaltet eine Sammlung von 147 Brustkrebsgeweben und 44 Normalgeweben, die in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet wurden. Die Sammlung beruht auf Gewebematerial von Spenderpatienten im Alter von 25 bis 82 Jahren, die in der Zeit von 1994 bis 2002 am Institut für Pathologie der Uni Regensburg diagnostiziert wurden und dieser Verwendung zugestimmt haben. Über das Tumorzentrum Regensburg standen die klinischen Nachsorgedaten der Patienten zur Verfügung.

II.1.11 Zelllinien

Für die Herstellung der Hybridomazellen und für die Charakterisierung der monoklonalen anti-RAI3 Antikörper sowie zur Charakterisierung des anti-fAChR Immuntoxins wurden folgende Zelllinien eingesetzt.

| Zelllinie | Eigenschaft | Ursprung | Herkunft/Referenz |
|------------|-------------|------------------------|---------------------|
| Sp2/IL-6 | - | murines Myelom | ATCC: CRL-2016 [84] |
| HEK392T | - | Hamster Nierenzelle | ATCC: CRL-11268 |
| MDA-MB-231 | RAI3+ | Adenokarzinom Brust | ATCC: HTB-26 |
| ASPC-1 | RAI3+ | Adenokarzinom Pankreas | ATCC: CRL-1682 |

| | | | |
|---------|--------|-----------------------------|-----------------------------|
| RD | fAChR+ | embryonales Rhabdomyosarcom | ATCC: CCL-136 |
| TE-671 | fAChR+ | embryonales Rhabdomyosarcom | DSMZ: ACC 263 |
| FL-OH1 | fAChR+ | embryonales Rhabdomyosarcom | Olgahospital Stuttgart [85] |
| Ax-OH-1 | fAChR+ | alveolares Rhabdomyosarkom | Olgahospital Stuttgart [85] |
| RH-30 | fAChR+ | alveolares Rhabdomyosarkom | DSMZ: ACC 489 |
| A-204 | fAChR- | Rhabdomyosarkom | ATCC: HTB-82 |
| U937 | fAChR- | histiozytisches Lymphom | DSMZ : ACC 5 |
| L540 | fAChR- | Hodgkin Lymphom | DSMZ: ACC 27 |

II.1.12 Bakterienstämme

Für die Klonierungsarbeiten und zur bakteriellen Expression wurden folgende *E.coli* Bakterienstämme eingesetzt.

Tabelle II-3 Übersicht verwendete *E.coli* Stämme

| Stamm | Anwendung | Genotyp |
|---------------------------|------------|---|
| XL1blue MRF' (Statagene) | Klonierung | $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1$ |
| Rosetta 2 (DE3) (Novagen) | Expression | F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm (DE3) pRARE2 (CamR) |

II.1.13 Plasmide und Primer

Folgende Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit kloniert bzw. verwendet. Die entsprechenden Plasmidkarten sind im Anhang aufgeführt (VII.2).

Tabelle II-4 Übersicht eingesetzter Plasmide

| Plasmid | Anwendung | Eigenschaften | Ursprung |
|-----------------|---|--|--|
| pMS R III | Expression von RAI3 in Säugerzellen | bicistronische EGFP Expression, ohne Ig-kappa-Leader, His ₆ -Tag; myc-Tag | pSecTag2 (Invitrogen) und pIRES-eGFP (Clontech) [86] |
| pMS R GFP MH | Expression von RAI3GFP in Säugerzellen | Expression in Fusion mit GFP, ohne Ig-kappa-Leader, His ₆ -Tag; myc-Tag, kein Ig-κ-Leader | pSecTag2 (Invitrogen) [86] |
| pMT scFv35-ETA' | Expression von scFv35-ETA' in <i>E.coli</i> | pelB Leader, T7 Promotor | pET 27b (Novagen) [87] |

Die für die Klonierungen und Sequenzierungen verwendeten Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert und mittels HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) gereinigt. Sie wurden in einer 100 μM wässrigen Lösung gelagert, aus der die jeweilige Arbeitslösung von 10 μM hergestellt wurde. Die Lagerung erfolgte jeweils bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Die Sequenzen der verschiedenen Primer sind im Anhang aufgeführt (VII.3).

II.2 Methoden zur Herstellung monoklonaler Antikörper

II.2.1 Immunisierung von BALB/c Mäusen

Für die Immunisierung mit dem von der Firma M-Fold Biotech gelieferten GPCR RAI3 wurden drei sechs bis acht Wochen alte weibliche BALB/c Mäuse eingesetzt. Für die Erstinjektion („Priming“) wurden 100 μg Antigen mit 60 μl GERBU MM gemischt und intraperitoneal (i.p.) appliziert. Daraufhin wurden drei Folgeinjektionen („Boost“) in einem Intervall von zehn bis elf Tagen mit 50 μg Protein und 40 μl Adjuvanz durchgeführt. Zwei Tage vor der Fusion wurde ein finaler Boost mit 50 μg Antigen ohne Adjuvanz gegeben. Zur Kontrolle des spezifischen Antikörpertiters im Verlauf der Immunisierung wurden regelmäßig 10 μl Blutproben entnommen und in 10 μl PBS aufgenommen. Zusätzlich wurde eine Herzpunktion am Tag 45 durchgeführt, um den Antikörpertiter zum Zeitpunkt der Fusion zu überprüfen. Diese wurde anschließend zentrifugiert und das Serum-PBS Gemisch abgenommen. Der Verdünnungsfaktor durch die Zugabe von PBS wurde bei späteren Messungen berücksichtigt. Für die weitere Bearbeitung wurde das Serum bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

II.2.2 Generierung von Hybridomazelle

An Tag 45 der Immunisierung wurde basierend auf der von Köhler und Milstein entwickelten Hybridomatechnik eine Zellfusion zur Generierung Antikörper produzierender Hybridomzellen durchgeführt [10]. Angelehnt an dem von Lane *et al.* (1985) beschriebenen Protokoll wurde die Fusion in Anwesenheit von Polyethylenglycol (PEG) durchgeführt [88]. Erfolgreich immunisierten Mäusen wurde die Milz entnommen und die Milzzellen unter sterilen Bedingungen vereinzelt und in RPMI Medium zweimal gewaschen. Als Fusionspartner wurde die murine Myelomzelllinie Sp2/mIL-6 [84] eingesetzt, die ebenfalls zweimal in RPMI 1640 gewaschen und dann in einem Verhältnis von 1:5 mit den Milzzellen gemischt wurden. Die Fusion erfolgte durch langsame Zugabe von PEG-1500 (Sigma) und anschließender 1,5minütiger Inkubation im $37\text{ }^\circ\text{C}$ Wasserbad. Danach wurde schrittweise RPMI 1640 hinzu gegeben (1 ml in 1 min, 3 ml in 3 min, 10 ml in 3 min), um die Fusion langsam zu stoppen. Nach einer 5minütigen Inkubation im CO_2 Brutschrank bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ wurden die Zellen zentrifugiert und das Zellpellet in HAT-Medium (II.1.5) suspendiert. Die

fusionierten Zellen wurden anschließend auf sechs 96-Well Mikrotiterplatten mit insgesamt je 100 µl pro Well verteilt. Zur Verbesserung der Wachstumsbedingungen wurden 30 µl pro Well mit HAT-Medium aus konditioniertem Sp2/mIL-6 Medium vorgelegt. Die Platten wurden im CO₂ Inkubator bei 37°C und erhöhter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach sieben Tagen erfolgte ein Mediumwechsel. Nach zwölf Tagen konnten die Überstände im ELISA auf RAI3-spezifische Antikörper getestet werden (II.3.1.2).

II.2.3 Selektion Antikörper produzierender Hybridoma-Klone

Diejenigen Hybridomakolonien, die bei der Analyse der Überstände im ELISA ein positives Signal gezeigt haben (II.3.1.2), wurden durch die so genannte „limiting dilution“-Klonierung (LD) in HT-Medium (II.1.5) weiter vereinzelt, bis monoklonale Hybridomen generiert werden konnten. Die Überstände wurden wiederum im ELISA (II.3.1.2) analysiert, um Hybridomazelllinien, die RAI3-spezifische mAk produzieren, zu identifizieren. Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Nicole Redding (Fraunhofer IME, Aachen) durchgeführt.

II.3 Immunologische und proteinchemische Methoden

II.3.1 Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay

II.3.1.1 ELISA zur Bestimmung des Antikörpertiters in Mausseren

Zur Verfolgung des spezifischen Antikörpertiters im Serum immunisierter BALB/c Mäuse wurde ein indirekter ELISA durchgeführt. Nach Beschichtung der Mikrotiterplatten (high-bindin; Greiner Bio-One) mit dem Antigen RAI3 und Blockierung der freien Bindungsstellen mit Milchpulver wurde das Mausserum in Dreifachbestimmung in einer fortlaufenden Verdünnungsreihe (1:1000 bis 1:512000) aufgetragen. Durch Zugabe eines Peroxidasegekoppelten anti-Maus Antikörpers und des entsprechenden Substrates (ABTS) konnte anhand der Farbentwicklung und deren photometrischer Messung bei 405 nm im ELISA-Reader ELx 808 (BioTek) der spezifische Antikörpertiter dokumentiert werden. Die Messdaten wurden anschließend mittels Microsoft Excel ausgewertet. Genaue Angaben über Inkubationszeiten, verwendete Antikörper und Konzentrationen sowie das genaue Ablaufschema des Versuchs sind der Tabelle II-5 zu entnehmen. Zwischen den Inkubationsschritten wurde jeweils dreimal mit PBST (PBS, 0,1% (v/v) Tween 20) gewaschen.

Tabelle II-5 Übersicht ELISA zur Titerbestimmung

| Schritt | Komponente | Konzentration/Verdünnung | Volumen | Inkubation |
|----------------|---------------------|---|----------------|-------------------|
| Beschichten | RAI3 | 50 ng in PBS | 50 µl | üN, 4°C |
| Blockieren | Milchpulver | 2% (w/v) in PBS | 100 µl | 1 h, RT |
| 1. Antikörper | Mausserum | serielle 1:2 Verdünnung 1:1000 bis 1:512000 in PBS | 50 µl | 1 h, RT |
| 2. Antikörper | GAM ^{HRPO} | 1:5000 in PBS | 50 µl | 1 h, RT |
| Substrat | ABTS | nach Herstellerangaben (Roche) | 50 µl | 1 h, RT |

II.3.1.2 ELISA zur spezifischen Bindungsanalyse von Antikörpern

Zur Charakterisierung der Bindungsspezifität der polyklonalen und monoklonalen anti-RAI3 Antikörper wurden verschiedene Variationen des ELISAs durchgeführt. Zur Analyse der Überstände aus der LD wurde analog zu der in

Tabelle II-5 dargestellten Übersicht vorgegangen. Anstatt der Serumverdünnungen wurden die unverdünnten Überstände der Hybridomazellen eingesetzt. Weiterhin wurde die Konzentration des beschichteten Antigens (RAI3) variiert (0,3-200 ng) um eine konzentrationsabhängige Signalintensität zu untersuchen. Als Negativkontrollen wurden 50 µg folgender Proteine zur Beschichtung eingesetzt: BSA, CD30Ligand und GPR30 (GPCR analog zu RAI3 produziert). Die Messung wurde jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt.

II.3.1.3 ELISA zur Affinitätsbestimmung monoklonaler Antikörper

Die Affinität der monoklonalen anti-RAI3 Antikörper wurde nach Friguet *et al.* [89] in einem kompetitiven ELISA ermittelt. Diese beruht auf der Messung der in Lösung befindlichen freien Antikörper im ELISA nach Vorinkubation mit löslichem Antigen. Die Durchführung des ELISA erfolgte analog zu Kapitel II.3.1.1. Anstatt der Serumverdünnung wurde der jeweilige Antikörper mit konstanter Konzentration (1 nM) präinkubiert mit einer seriellen 1:2 Verdünnung des Antigens (ab 25 mM) aufgetragen. Die Konzentration des Antikörpers wurde dabei durch Voruntersuchungen so niedrig gewählt, dass eine direkte proportionale Abhängigkeit der Signalstärke von der Konzentration gewährleistet ist und gleichzeitig hoch genug um eine Signalunterdrückung detektieren zu können. Die Präinkubationszeit betrug eine Stunde wohingegen die Inkubation auf der Mikrotiterplatte auf 15 Minuten reduziert wurde, um das bestehende Gleichgewicht in Lösung nicht zu beeinträchtigen. Als

Referenzwert galt das Signal des Antikörpers ohne Antigen in Lösung. Die Messung wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt. Anhand der Absorption konnte die Dissoziationskonstante K_d (reziproke Affinität) nach folgender Formel berechnet werden.

$$K_d = (A_{K_g} * A_g - A_g * A_{gAk}) / A_{gAk}$$

Erläuterung:

A_{K_g} : Gesamtkonzentration der Antikörperbindestellen (doppelte Antikörperkonzentration)

A_{gAk} : Konzentration des Antikörper-Antigen-Komplexes ($A_{gAk} = A_{K_g} - A_{K_f}$)

A_{K_f} : Konzentration des freien Antikörpers ($A_{K_f} = (A_{K_g} * A) / A_0$)

A_0 : Absorption der Kontrollprobe ohne Antigen

A : Absorption des untersuchten Wells

A_g : Konzentration des freien Antigens ($A_g = A_{g_g} - A_{gAk}$)

A_{g_g} : Gesamtkonzentration des inkubierten Antigens im untersuchten Well

Pro Antikörper wurde die Berechnung anhand dreier Antigenkonzentrationen durchgeführt und der daraus resultierende Mittelwert als K_d -Wert angenommen.

II.3.1.4 ELISA zur Isotypenbestimmung monoklonaler Antikörper

Die Isotypenbestimmung der monoklonalen anti-RAI3 Antikörper wurde mittels BD Isotyping Kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

II.3.2 SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

Zur Trennung und zum Nachweis von Proteinen wurde die denaturierende, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli *et al.* eingesetzt [90]. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das SDS-PAA-Gel mit SDS-Ladepuffer versetzt und anschließend 5 min bei 95°C denaturiert. Als Größenstandard diente der „Prestained Protein Marker, broad range“ (NEB). Die Auftrennung erfolgte im Mini-Protean®-Modul (Bio-Rad) in der Regel bei 150 bis 160 V für 60 bis 70 min. Proteine wurden anschließend durch Coomassie Brillant Blau-Färbung visualisiert [91]. Die Dokumentation erfolgte durch Scannen im HP Scanjet 4890 und anschließende digitale Speicherung.

Coomassie-Färbelösung

| | |
|-------------|-------------------------------|
| 0,25% (w/v) | Coomassie Brillant Blue G-250 |
| 50% (v/v) | Methanol |
| 9% (v/v) | Essigsäure bzw. Eisessig |
| 2% (v/v) | Trichloressigsäure |

Coomassie-Entfärbelösung

| | |
|------------|------------|
| 5% (v/v) | Methanol |
| 7,5% (v/v) | Essigsäure |

4%iges Sammelgel (2 Gele)

| | |
|----------|--|
| 3,645 ml | H ₂ O |
| 625 µl | 1 M Tris-HCl, pH6,8 |
| 830 µl | 30% Acrylamid |
| 50 µl | 10% (w/v) Natrium-Dodecylsulfat (SDS) |
| 5 µl | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) |
| 15 µl | 20% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS) |

10%iges Trenngel (2 Gele)

| | |
|---------|---------------------|
| 2,12 ml | H ₂ O |
| 3,75 µl | 1 M Tris-HCl, pH8,8 |
| 3,3 ml | 30% Acrylamid |
| 100 µl | 10% (w/v) SDS |
| 10 µl | TEMED |
| 30 µl | 20% (w/v) APS |

12%iges Trenngel (2 Gele)

| | |
|---------|---------------------|
| 2,12 ml | H ₂ O |
| 3,75 µl | 1 M Tris-HCl, pH8,8 |
| 4 ml | 30% Acrylamid |
| 100 µl | 10% (w/v) SDS |
| 10 µl | TEMED |
| 30 µl | 20% (w/v) APS |

5x SDS-PAGE-Laufpuffer

| | |
|------------|----------|
| 125 mM | Tris-HCl |
| 960 mM | Glycin |
| 0,5% (w/v) | SDS |

5x SDS-Probenpuffer, pH 6,8

| | |
|-------------|-------------------|
| 62,5 mM | Tris-HCl |
| 30% (w/v) | Glyzerin |
| 4% (w/v) | SDS |
| 10% (v/v) | β-Mercaptoethanol |
| 0,05% (w/v) | Bromphenolblau |

II.3.3 Western Blot Analyse

Mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden im Mini-Trans Blot®-Modul von Bio-Rad auf Nitrozellulosemembranen (Schleicher & Schüll) transferiert und die Membran mit 2% (w/v) Milchpluver in PBST eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Die Inkubation des Erstantikörpers erfolgte in der Regel ebenfalls für eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht. Als Sekundärantikörper wurden sowohl Peroxidase (PO)-gekoppelte als auch alkalische Phosphatase (AP)-gekoppelte Antikörper eingesetzt (II.1.8). Der direkte Nachweis monoklonaler Antikörper erfolgte über den Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper. Je nach Enzymkopplung wurde das Enhanced Chemilumineszenz (ECL)-Substrat (Pierce) oder NBT/BCIP zur Proteinvisualisierung eingesetzt. Die Dokumentation des Chemilumineszenz-Signals erfolgte im LAS-3000 Imager (Fujifilm). Nach der Farbentwicklung des präzipitierten Substrats wurden die Membranen zur Dokumentation im HP Scanjet 4890 gescannt und in digitaler Form gespeichert.

Blotting-Puffer, pH 8,3

| | |
|-------------|----------|
| 25 mM | Tris-HCl |
| 192 mM | Glycin |
| 20% (v/v) | Methanol |
| 0,05% (w/v) | SDS |

5x AP Puffer , pH 9,6

| | |
|--------|----------|
| 500 mM | Tris-HCl |
| 500 mM | NaCl |
| 25 mM | MgCl |

NBT/BCIP-Stock

3,33%(w/v) Nitro-Blau Tetrazolium Chlorid (NBT)
1,67%(w/v) 5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphat p-Toluidinsalz (BCIP)
in Dimethylformamid

NBT/BCIP-Substratlösung

1:100 Verdünnung der Stocklösung in 1xAP-Puffer

II.3.3.1 Western Blot-Analysen von Zell-und Gewebelysaten

Für die Analyse der Zell-und Gewebelysate im Western Blot wurden die Lysate mit ca. 10 µg Gesamtprotein pro Probe mittels SDS-PAGE (II.3.2) getrennt und auf Nitrozellulose transferriert (II.3.3). Nach Blockieren erfolgte die Inkubation mit anti-RAI3 Antikörpern (100 ng/ml in PBST) bei 4°C über Nacht (üN). Nach dreimaligem 20minütigem Waschen mit PBST bei Raumtemperatur erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper GAM^{HRPO} (1:5000, PBST) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen in PBST erfolgte die Substratinkubation mit ECL nach Herstellerangaben. Anschließend wurde die Membran durch Inkubation bei 50°C, 45 min in Stripping-Puffer inkubiert, um gebundene Antikörper zu entfernen. Als Ladekontrolle wurden die Membranen nach intensivem Waschen mit dem β-Actin^{HRPO} Antikörper (1:1000, in PBST), eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Substratentwicklung erfolgte wie zuvor beschrieben.

Stripping-Puffer

62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8)
2% (w/v) SDS
100 mM β-Mercaptoethanol

II.3.3.2 Western Blot-Analyse rekombinanter Proteine

Rekombinante Proteine wurden ebenfalls im Western Blot analysiert. Dazu wurden in der Regel 10 µl einer Probe eingesetzt. Die Detektion von scFv35-ETA' erfolgte mittels TC-1 (1:1000) oder αHis-Antikörper (1:5000) (Tabelle II-2). Als Sekundärantikörper wurde ein AP-gekoppelter anti-Maus Antikörper eingesetzt. Vor der Substratentwicklung wurde die Membran 5 min in 1xAP-Puffer äquilibriert.

II.3.4 Herstellung von Zelllysaten

Zellen einer voll bewachsenen T75-Zellkulturflasche wurden mit eiskalten PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml eiskalter Zelllysispuffer hinzugegeben, die Zellen mittels Zellschaber abgelöst und in ein steriles, vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Lyse wurde darin für 30 min bei 4°C unter Schütteln fortgeführt. Feste Bestandteile wurden

durch Zentrifugation bei 4°C, 16.000xg, 20 min abgetrennt. Die Gesamtproteinkonzentration im Überstand wurde mittels Bradford (II.3.11.1) bestimmt. Die aliquotierten Überstände wurden bei -80°C gelagert.

Zelllysispuffer

| | |
|-----------|-------------------------------------|
| 20 mM | Tris-HCl (pH 8) |
| 137 mM | NaCl |
| 10% (w/v) | Glycerol |
| 2 mM | Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) |
| 1% (v/v) | Triton X-100 |

II.3.5 Durchflusszytometrie für Bindungsanalysen an Zelloberflächen

Für die Analysen wurden jeweils 5×10^5 Zellen in ein FACS-Röhrchen (BD) überführt und im Dade Serotec Zellwascher einmal mit 1,8 ml PBS gewaschen und zentrifugiert. Zum Test der Bindungsaktivität der monoklonalen anti-RAI3 Antikörper wurden RAI3-positive Zelllinien (MDA-MB-231, ASPC-1), sowie RAI3-transfizierte und native HEK293T Zellen eingesetzt. Gewaschene Zellen wurden 30 min auf Eis mit den monoklonalen anti-RAI3 Antikörpern in einer 1:50 Verdünnung (in 100 µl PBS, 0,5% (w/v) BSA) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper GAM^{PE} (1:40 in 40 µl PBS, 0,5% (w/v) BSA) erneut 30 min auf Eis. Nach dem zweiten Inkubationsschritt wurden die Zellen zweimal gewaschen und in 300 µl PBS aufgenommen. Für jede Messung wurde auch eine Sekundärantikörperkontrolle zur Bestimmung der unspezifischen Bindung des Sekundärantikörpers durchgeführt. Die Messungen erfolgten im FACScalibur (Becton Dickinson) und wurden mit der Software WinMDI 2.8 ausgewertet.

Zur Bestimmung der Bindungsaktivität des anti-fAChR Immuntoxins scFv35-ETA' wurde ebenfalls eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Diese erfolgte analog zur oben beschriebenen Vorgehensweise. Als Primärantikörper wurde das gereinigte Immuntoxin mit einer Konzentration von 1 µg in 100 µl PBS, 0,5% (w/v) BSA eingesetzt. Der Nachweis der Bindung erfolgte mittels ETA-spezifischen Antikörpers TC-1 in einer 1:100 Verdünnung und anschließender Inkubation mit GAM^{PE} (1:40). Als fAChR-positive Zelllinien wurden die embryonalen RMS Zelllinien RD, TE-671 und FL-OH-1 sowie die alveolären RMS Zelllinien RH-30 und Ax-OH-1 eingesetzt. Die Zelllinien A-204 und U937 dienten als Negativkontrolle.

II.3.6 Immunfluoreszenzfärbung und konfokale Mikroskopie

Transient transfizierte HEK293T Zellen (II.5.2), die RAI3-GFP produzieren, wurden mit $2,5 \times 10^4$ Zellen pro Well einer Multi-Chamber Slide (Nunc) plattiert und üN bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Die angehefteten Zellen wurden in 4% (w/v) Paraformaldehyd fixiert, mit PBS gewaschen und anschließend eine Stunde bei RT in PBS, 0,5% (v/v) Triton X-100, 3% (w/v)

BSA permeabilisiert und blockiert. Die Färbung erfolgte mit einer 1:100 Verdünnung des anti-RAI3 Antikörpers 24 2.3 eine Stunde bei RT. Als Negativkontrolle wurde in PBS ohne Primärantikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS, 0,5% (v/v) Triton X-100 erfolgte die Detektion der Bindung über den A546 Antikörper (1:2000), der eine Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert wurde. Nach erneutem Waschen erfolgte die Kernfärbung mit einer 20 µM Lösung Draq5 (Biostatus) in PBS. Zum Abschluss wurden die gefärbten Zellen erneut fixiert und konnten so für die konfokale Mikroskopie eingesetzt werden. Die Anregung erfolgte bei 488, 561 und 635 nm (RAI3-GFP, AlexaFluor 546, Draq5). Die Emissionssignale wurden über Emissionsbandfilter mit 540/75, 600/40 und 685/70 nm detektiert. Die Filter wurden dabei so eingestellt, dass keine Überschneidungen der Einzelsignale detektiert wurden. Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Stefano DiFiore (Fraunhofer IME) durchgeführt. Die Bildauswertung und Farbgebung erfolgten mittels Adobe Photoshop.

II.3.7 Immunhistochemie an Paraffin-Gewebe

Die Gewebeschnitte auf Objektträgern wurden zur Vorbehandlung zunächst 30 min bei 72°C inkubiert. Danach erfolgte die Entfernung des Paraffins in Xylol und Rehydrierung in einer absteigenden Ethanolreihe (2xXylol je 10 min, 1x100% (v/v) Ethanol 5 min, 2x95% (v/v) Ethanol je 1 min, 1x 70% (v/v) Ethanol 1 min, milliQ-Wasser). Anschließend wurden die Objektträger in Zitratpuffer (100 mM, pH 7,2) überführt und bei ca. 200 W in der Mikrowelle 30 min vorbehandelt. Nach dem Abkühlen wurden die Schnitte in Coverplates eingespannt und mit Wasser gewaschen. Die Blockierung der endogenen PO erfolgte mittels Dako REAL PO-Blockierlösung S2023 (Dako). Nach einem Waschschrift mit 1x Waschpuffer (Dako S3006) wurden die Schnitte mit 100 µl anti-RAI3 Antikörpern in einer Verdünnung von 1:50 und/oder 1:100 in Verdünnungspuffer (Dako S2022) 3,5 Stunden bei 4°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde der Antikörper in diesem Schritt weggelassen. Anschließend wurde erneut mit Waschpuffer gewaschen. Die Färbung erfolgte mit dem EnVision Detection System K5007 von Dako nach Herstellerangaben. Dieses beinhaltet ein PO-gekoppeltes Sekundärantikörpergemisch und Diaminobenzidin (DAB) als Substrat. Direkt nach der Färbung werden die Präparate in Wasser gewaschen und es wurde eine Gegenfärbung mit Hämalaun durchgeführt. Nach 5minütiger Inkubation in Hämalaun wurde mit lauwarmem Leitungswasser 10 min gespült (bläuen). Eine abschließende aufsteigende Ethanolreihe (70% (v/v) Ethanol, 95% (v/v) Ethanol, 2x100% (v/v) Ethanol, 2x Xylol, je 1 min) erfolgte zur Dehydrierung der Gewebeschnitte. Zum Schluss wurden die gefärbten Schnitte mit Vitro-Clud Eindeckmittel (R.Langensbrinck) und 24x60 mm Deckgläsern (Automat-Star) eingedeckelt und konnten getrocknet im Dunkeln gelagert werden.

Es wurde ebenfalls eine kompetitive Färbung in der Immunhistochemie durchgeführt. Dazu wurde der anti-RAI3 Antikörper 24 2.3 mit 200-fach molarem Überschuss RAI3 Antigen eine Stunde bei Raumtemperatur vorinkubiert und anschließend wie beschrieben für die Färbung eingesetzt.

Die Auswertung der Färbung des TMAs wurde durch die Pathologin Dr. Nuran Bektas am Uniklinikum Aachen anhand des Bewertungssystems nach Remmele und Stegner durchgeführt [92].

Hämalaun Stammlösung

0,1% (w/v) Hämatoxylin
0,02% (w/v) Natriumjodat
5% (w/v) Aluminiumkaliumsulfat

Hämalaun Gebrauchslösung

5% (w/v) Chloralhydrat
0,1% (w/v) Zitronensäure
in Stammlösung

II.3.8 Reinigung monoklonaler Antikörper über Protein G Affinitätschromatographie

Monoklonale Hybridomen wurden expandiert und an serumfreies ISF-1 Medium (Biochrom AG) adaptiert. Zur Reinigung wurden 100 ml Mediumüberstand mit 4x Bindepuffer (200 mM NaH_2PO_4 , 600 mM NaCl, pH 6,7) äquilibriert und anschließend filtriert (0,45 μm). Die Reinigung erfolgte im ÄKTA_{FPLC} System (GE Healthcare) und einer 1 ml HiTrap Protein G HP-Säule (GE Healthcare). Der äquilibrierte Überstand wurde mit einer Flussrate von 1 bis 2 ml/min über einen Probenloop auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 1x Bindepuffer bis zum Erreichen der UV-Basislinie gewaschen. Die gebundenen Antikörper wurden mit einem Glycinpuffer (200 mM Glycin, pH 2,7) in 1 ml Fraktionen eluiert. Zur Neutralisierung wurden 0,2 ml Tris-Puffer (1 M, pH 9) zur Elutionsfraktion zugegeben.

4xBindepuffer, pH 6,7

200 mM NaH_2PO_4
600 mM NaCl

Elutionspuffer, pH 2,7

200 mM Glycin

II.3.9 Expression und Reinigung rekombinanter Proteine

II.3.9.1 Periplasmatische Expression rekombinanter Proteine in *E.coli* unter osmotischen Stressbedingungen

Die Expression des rekombinanten Immuntoxins scFv35-ETA' erfolgte durch Fermentation im 4 Liter-Maßstab und wurde in Zusammenarbeit mit Dirk Scheffler (FhG IME) durchgeführt. Dazu wurde der *E.coli* Bakterienstamm Rosetta2 (DE3) (Novagen) eingesetzt, der mit dem Expressionsplasmid pMTscFv35-ETA' transformiert wurde. Die Vorkultur zur Inokulation

wurde in 100 ml TB-Medium mit Kanamycin μ N bei 37°C angezogen. Die Fermentation wurde in synthetischem Minimalmedium mit Glukose als Kohlenstoffquelle durchgeführt. Die Proteininduktion erfolgte bei 26°C durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) für 24 Stunden. Vor der Induktion mit 0,5 mM IPTG wurden die Bakterien durch Zugabe von 300 mM NaCl und 40 mM Betain und 125 mM Sorbitol unter osmotischen Stress gesetzt, um eine optimale Proteinfaltung zu gewährleisten.

Synthetisches Minimalmedium

| | |
|---------------|---|
| 1,66 % (w/v) | KH ₂ PO ₄ |
| 0,4 % (w/v) | NH ₄ (H ₂ PO ₄) |
| 0,007 % (w/v) | CaCl ₂ *2H ₂ O |
| 0,014 % (w/v) | FeSO ₄ *7H ₂ O |
| 2,5 % (w/v) | Glukose |
| 0,15 % (w/v) | MgSO ₄ *7H ₂ O |
| 0,21 % (w/v) | Zitronensäure |
| 0,1 % (v/v) | PTM1-Basalsalze |
| 2,5 % (w/v) | Kanamycin |
| 0,02 % (w/v) | Methionin |

II.3.9.2 Bakterieller Zellaufschluss mittels Hochdruckhomogenisators

Im Anschluss an die Fermentation wurden 500x g Bakterienpellet in 2 L PBS/ 1 M NaCl resuspendiert und mittels Hochdruckhomogenisator (Microfluidics, Newton) bei 1150 bar aufgeschlossen. Es wurden insgesamt zwei Durchläufe durchgeführt. Zellbestandteile wurden anschließend durch Zentrifugation bei 9000xg, 45 min abgetrennt. Der Überstand (Lysat) wurde für die Reinigung mittels IMAC eingesetzt.

II.3.9.3 Reinigung rekombinanter Proteine über Immobilisierte-Metallionen-Affinitäts-Chromatographie

Nach Zellaufschluss wurde das Lysat direkt im „Expanded Bed Adsorption“-System mittels Streamline-Chelating Matrix (GE-Healthcare), die mit 200 mM Kobaltchlorid beladen wurde vorgereinigt. Nach dem Probenauftrag erfolgte ein Waschschrift mit PBS, 1M NaCl, 40 mM Imidazol. Durch Erhöhung der Imidazolkonzentration auf 500 mM wurden gebundene Proteine eluiert. Im Anschluss daran wurde das Eluat in 35 mM Tris Puffer (1 M NaCl, pH 8) umgepuffert und im ÄKTA_{FPLC}-System einem weiteren Reinigungsschritt der Immobilisierten-Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) über eine TALON Superflow Matrix unterzogen. Dazu wurden 5 ml TALON Superflow Matrix eingesetzt. Um eine möglichst hohe Reinheit des Proteins zu erhalten, wurden zwei Waschritte (20 mM und 40 mM Imidazol) durchgeführt. Die Elution erfolgte in 35 mM Tris, 1 M NaCl, 500 mM Imidazol, pH 8. Die weitere Reinigung des Eluats erfolgte über eine Anionenaustauschchromatographie (II.3.9.4).

II.3.9.4 Reinigung rekombinanter Proteine über Ionenaustauschchromatographie

Als weiteren Reinigungsschritt wurde eine Anionenaustauschchromatographie eingesetzt. Anhand des isoelektrischen Punktes des Immuntoxins scFv35-ETA' (pI 6,1) wurden die optimalen Pufferbedingungen (25 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8) gewählt. Die Reinigung erfolgte im ÄKTA_{FPLC}-System unter Verwendung der Q-Sepharose Fast Flow Matrix (GE Healthcare) mit einem Säulenvolumen von 5 ml und 2,5 cm Gelbetthöhe in einer XK 16/20 Säule (GE Healthcare). Vor der Elution durch Erhöhung der Salzkonzentration auf 1 M wurde ein Waschschrift mit 150 mM Salz durchgeführt.

II.3.9.5 Reinigung rekombinanter Proteine über Größenausschlusschromatographie

Als finaler Reinigungsschritt wurde eine Größenausschlusschromatographie oder Gelfiltration durchgeführt. Da diese Methode die Trennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichtes erlaubt, können neben verbleibenden niedermolekularen Verunreinigungen auch Dimere oder sonstige Polymere des rekombinanten Proteins abgetrennt werden. Durch Equilibrierung der Säule in PBS, kann das Protein gleichzeitig in PBS umgepuffert werden. Für diese Reinigung wurde ebenfalls das ÄKTA_{FPLC}-System eingesetzt. Die verwendete XK16/70 Säule wurde dafür mit 120 ml Superdex 200 (beides GE Healthcare) gepackt. Die Gelbetthöhe betrug dabei 60 cm.

II.3.10 Konzentrieren und Umpuffern von Proteinen

Die Konzentrierung gereinigter Proteine erfolgte in 15 ml Centiprep-Säulen (Millipore) mit einem Cut-Off von 10 kDa nach Angaben des Herstellers. Das Umpuffern von Proteinlösungen erfolgte durch Membranfiltration (Vivaspin (Sartorius) 10 kDa Cut-Off) oder durch Dialyse. Die Dialyse wurde bei 4°C unter Rühren mit dreifachem Pufferwechsel über 24 Stunden durchgeführt.

II.3.11 Proteinkonzentrationsbestimmung

II.3.11.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen erfolgte nach dem Prinzip von Bradford [93]. Dazu wurde das Bradford-Reagenz Roti-Quant (Roth) nach Herstellerangaben eingesetzt. Die photometrische Messung erfolgte bei 595 nm. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Standardgeraden mit BSA bestimmt. Die Messungen der Standardreihe sowie der Proteinprobe wurden jeweils im dreifachen Ansatz durchgeführt.

II.3.11.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels densitometrischen Verfahren

Die Proteinkonzentration wurde ebenfalls mittels densitometrischer Messung der Proteinbanden im SDS-Gel bestimmt. Dazu wurde eine SDS-PAGE und Coomassie-Färbung mit einer BSA-Standardreihe (200-2000 ng) und dem zu messenden Protein durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Software AIDA (advanced image data analyzer v.4.1.14).

II.3.12 Serumstabilitätstest

Die Untersuchung der Serumstabilität des gereinigten Immuntoxins scFv35-ETA' erfolgte durch Inkubation in humanem Serum bei 37°C für unterschiedliche Zeiträume. Dazu wurden 20 µg Immuntoxin in 50 µl PBS mit 50 µl humanem Serum vermischt und bei 37°C inkubiert. Die Probenahme erfolgte nach 0, 6, 12, 24 und 48 Stunden. Als Kontrolle wurde auch eine Inkubation in PBS durchgeführt und Kontrollproben nach 0, 24 und 48 Stunden genommen. Die Proben wurden anschließend mittels Western Blot und Detektion über den aHis Antikörper analysiert. Mittels AIDA-Software konnte die Abnahme der Proteinkonzentration der einzelnen Proben bestimmt werden (Ausgangskonzentration: 250 ng pro Probe). Es wurde ebenfalls eine Kontrolle der Bindungsaktivität mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Dazu wurden dieselben Proben (1 µg Ausgangsmenge) wie beschrieben auf ihre Bindung an fAChR-positiven FL-OH-1 Zellen untersucht (II.3.5). Anhand der Reduktion der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Ausgangsprobe konnte die Reduktion der Bindungsaktivität ermittelt werden.

II.3.13 Lagerung der monoklonalen Antikörper

Gereinigte monoklonale anti-RAI3 Antikörper wurden mit 1% (w/v) BSA versetzt und in 100 µl Aliquots lyophilisiert. Lyophilisierte Proben wurden bei 4°C gelagert.

II.3.14 Lagerung der rekombinanten Proteine

Gereinigte rekombinante Proteine wurden sterilfiltriert (0,2 µm) mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml in 250 µl Aliquots in PBS bei -20°C gelagert.

II.4 Molekularbiologische Methoden

II.4.1 Plasmid-DNA Präparation

Für die Präparation von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab wurden 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bzw. Kanamycin mit Einzelkolonien transformierter Bakterien angeimpft

und bei 37°C im Rotationsinkubator inkubiert. Am Folgetag wurden ca. 3 ml der Suspension zentrifugiert und die Plasmid DNA mittels NucleoSpin Plasmid (Tabelle II-1) nach Herstellerangaben isoliert und gereinigt. Durch eine anschließende Restriktionsanalyse (II.4.5) und elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel (II.4.2) wurde die Plasmid-DNA verifiziert.

II.4.2 Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse von RNA- und DNA-Fragmenten (II.4.4, II.4.5, II.4.11) wurden diese entsprechend ihrer Größe in der Regel auf 1%igen Agarosegelen mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid aufgetragen und bei 5 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte im TAE-Puffersystem nach Sambrook *et al.* [81]. Zur Größenabschätzung wurden entsprechende Längenstandards eingesetzt (2-log ladder, NEB). Die Visualisierung und Fotodokumentation der DNA- bzw. RNA-Banden erfolgte durch das „Gel Doc XR System“ von Bio-Rad. Die Agarosegelelektrophorese wurde ebenfalls für präparative Zwecke eingesetzt. Dabei wurden größere Mengen an DNA wie oben beschrieben separiert, anschließend unter UV-Bestrahlung aus dem Gel geschnitten und für die weitere Verwendung mittels NucleoSpin Extract II Kit (Tabelle II-1) gereinigt.

II.4.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration an DNA und RNA wurden photometrisch bei 260nm bestimmt. Der Reinheitsgrad der DNA, der sich aus dem Absorptionsquotienten der Messungen bei 260nm und 280nm (Proteinabsorption) ergibt, sollte über 1,8 liegen.

II.4.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur Klonierung von pMS R III und pMS RGFP MH (VII.2) eingesetzt. Dazu wurden RAI3-spezifische Primer komplementär zu den flankierenden Regionen generiert. Zusätzlich wurden Restriktionsschnittstellen sowie die Kozak Konsensus-Sequenz über die Primer an das RAI3-Gen eingefügt, die die Klonierung in den pMS-Vektor ermöglichen. Die Primersequenzen sind im Anhang aufgeführt (VII.3). Als Template wurde das von der Firma M-Fold Biotech zur Verfügung gestellte Plasmid pGEX-RAI3 eingesetzt, das die komplette, native RAI3 Sequenz enthält. Die verwendete Phusion DNA Polymerase (Finnzymes) gewährleistet die fehlerfreie Amplifikation des Gens. Der PCR Ansatz sowie das Reaktionsschema sind in Tabelle II-6 und Tabelle II-7 dargestellt.

Tabelle II-6 Übersicht PCR-Reaktionsansatz

| Reaktionskomponente | Konzentration |
|---------------------------------|---------------|
| Phusion HF Puffer (5x) | 1x |
| dNTP-Mix (10 mM) | 0,2 mM |
| 5'-Primer (10 µM) | 0,5 µM |
| 3'-Primer (10 µM) | 0,5 µM |
| Template-DNA | 10 ng |
| Phusion DNA Polymerase (2 U/µl) | 0,02 U/µl |
| H ₂ O | ad 50 µl |

Tabelle II-7 Reaktionsschema PCR

| Reaktionsschritt | Temperatur | Dauer | Zyklen |
|------------------------|------------|--------|--------|
| Initiale Denaturierung | 98°C | 30 s | 1x |
| Denaturierung | 98°C | 10 s | } 35x |
| Annealing | 55°C | 15 s | |
| Elongation | 72°C | 15 s | |
| Finale Elongation | 72°C | 10 min | 1x |

Die PCR-Reaktion wurde im Eppendorf PCR-Cycler durchgeführt. Im Anschluss an die PCR wurde ein Agarosegel (II.4.2) zur Kontrolle der PCR-Reaktion durchgeführt. Bei erfolgreicher PCR wurde die amplifizierte DNA mittels NucleoSpin Extract II Kit (Tabelle II-1) gereinigt und für den nachfolgenden Restriktionsverdau (II.4.5) eingesetzt.

II.4.5 Restriktionsverdau von DNA

Der Restriktionsverdau von Plasmiden (II.4.1) und PCR-Fragmenten (II.4.4) wurde nach Herstellerangaben mit den mitgelieferten Puffern unter Berücksichtigung der optimalen Inkubationstemperatur durchgeführt. In der Regel wurde 1 µg DNA mit 5-10 Units Enzym bei 37°C, 2 Stunden verdaut. Bei dem Doppelverdau mit *Sfi*I und *Not*I wurde nacheinander unter optimalen Temperaturbedingungen verdaut. Neben der Vorbereitung von DNA-Fragmenten zur Ligation, wurde der Restriktionsverdau auch zur Überprüfung erfolgreicher Klonierungen eingesetzt (II.4.10). Dazu wurde die Plasmid-DNA der transformierten Bakterien mit Restriktionsenzymen geschnitten, die eindeutige Restriktionsmuster zur Identifizierung erfolgreicher Ligationen erzeugten.

II.4.6 Dephosphorylierung von DNA

Nach der Restriktion wurde die Plasmid-DNA (II.4.1) mit der Antarctic Phosphatase (NEB) nach Herstellerangaben dephosphoryliert und das Enzym anschließend bei 65°C deaktiviert. Die Abspaltung des 5'-Phosphatrestes durch die Phosphatase verhindert die Religation des Vektors nach der Restriktion und führt so zu einer besseren Ligationseffizienz.

II.4.7 Reinigung der DNA nach enzymatischen Reaktionen

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten nach Restriktionsverdau (II.4.5), Dephosphorylierung (II.4.6) oder PCR (II.4.4) wurde das NucleoSpin Extract II Kit (Tabelle II-1) nach Herstellerangaben eingesetzt.

II.4.8 Ligation von DNA

Die Ligation geschnittener-PCR-Produkte (II.4.4, II.4.5) in pMS-Vektoren erfolgte mit der Quick Ligase von NEB nach Herstellerangaben. Das Verhältnis von Vektor-DNA zu „Insert“-DNA sollte dabei 1:3 betragen.

II.4.9 Herstellung Hitzeschock-kompetenter Bakterien

Hitzeschock-kompetente *E.coli* XL1-blue wurden nach Hanahan [94] hergestellt und bei -80°C gelagert. Kompetente *E.coli* Rosetta2 (DE3) wurden von der Firma Novagen bezogen und in 6 µl Aliquots bei -80°C gelagert.

II.4.10 Hitzeschock-Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien

Für die Hitzeschock-Transformation von *E.coli* XL1-blue wurden 50 µl kompetente Zellen (II.4.9) auf Eis aufgetaut und nach Zugabe des Ligationsansatzes (II.4.8) bzw. 100 ng der Plasmid-DNA (II.4.1) 30 min auf Eis inkubiert. Danach folgten ein einminütiger Hitzeschock bei 42°C und eine erneute Abkühlung für wenige Minuten auf Eis. Zur Regeneration der Zellen wurden 900 ml SOC-Medium hinzu gegeben und der Transformationsansatz 30 bis 60 min im Rotationsinkubator bei 37°C inkubiert. Nach der Regeneration wurde entweder der gesamte Ansatz durch Zentrifugation sedimentiert und anschließend das ganze Zellpellet auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausplattiert, oder es wurden verschiedene Volumina des Ansatzes auf mehrere Platten ausplattiert. Bei der Transformation von Rosetta2 (DE3) wurden 3 µl kompetente Zellen eingesetzt und mit 50 µl SOC-Medium zur Regeneration versetzt.

II.4.11 Isolation der Gesamt-RNA aus Säugerzellen

Zur Isolation der Gesamt-RNA aus Säugerzelllinien wurden 1×10^6 Zellen eingesetzt und mittels NucleoSpin RNA II (Tabelle II-1) nach Herstellerprotokoll verarbeitet. Die isolierte RNA wurde zur Qualitätskontrolle auf einem 1%igen analytischen Agarosegel (II.4.2) aufgetrennt.

II.4.12 cDNA-Synthese und RT-PCR

Die Erststrang cDNA-Synthese aus der isolierten Gesamt-RNA (II.4.11) wurde mittels SuperScript™ III „First Strand cDNA Synthesis System“ und SuperScript™ III „Reverse Transcriptase“ (beides Invitrogen) nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Dabei wurden die vom Hersteller mitgelieferten oligo-dT Primer verwendet.

Im Anschluss an die Erststrangsynthese erfolgte eine PCR zur Genanalyse der fAChR Expression. Dazu wurden Primer eingesetzt, die spezifisch in den codierenden Regionen des Gens der α - bzw. der γ -Untereinheit des Rezeptors binden. Zur Differenzierung zwischen dem embryonalen und dem alveolären Subtyps der RMS Zelllinien wurden auch Primer eingesetzt, die die PAX3-FKHR Genfusion detektieren. Als Kontrolle wurden GAPDH-spezifische Primer eingesetzt. Die Primersequenzen sind im Anhang aufgeführt (VII.3). Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes sowie das Reaktionsschema sind Tabelle II-6 und

Tabelle II-7 zu entnehmen. Zur Analyse der Amplifikation wurde im Anschluss eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt (II.4.2).

Tabelle II-8 Übersicht RT-PCR

| Reaktionskomponente | Konzentration |
|---------------------------------------|----------------------|
| Phusion HF Puffer (5x) | 1x |
| dNTP-Mix (10 mM) | 0,2 mM |
| 5'-Primer (10 μ M) | 0,5 μ M |
| 3'-Primer (10 μ M) | 0,5 μ M |
| Template-DNA | 10 ng |
| Phusion DNA Polymerase (2 U/ μ l) | 0,02 U/ μ l |
| H ₂ O | ad 50 μ l |

Tabelle II-9 Reaktionsschema RT-PCR

| Reaktionsschritt | Temperatur | Dauer | Zyklen |
|------------------------|------------|-------|--------|
| Initiale Denaturierung | 95°C | 5 min | 1x |
| Denaturierung | 95°C | 30 s | } 35x |
| Annealing | 55°C | 30 s | |
| Elongation | 72°C | 30 s | |
| Finale Elongation | 72°C | 5 min | 1x |

II.4.13 Herstellung von Glyzerin-Stammkulturen

Zur Sicherung transformierter Bakterien (II.4.10) wurden 500 µl einer Über-Nacht-Kultur mit 50% (w/v) Glyzerin versetzt und bei -80°C gelagert.

II.4.14 Sequenzierung und Analyse der DNA

Als weitere Kontrolle der Klonierung wurde die DNA einer positiven Kolonie (II.4.5) mittels „ABI Prism Analyser 3730“ und dem „BigDye Termination“ Kit sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode nach Sanger [95]. Für die Sequenzierung wurden 140 bis 160 ng/kb Plasmid-DNA (II.4.1) mit 20 pmol des Sequenzierprimers in einem Volumen von insgesamt 30 µl eingesetzt. Die Sequenzdaten wurden anschließend durch die DNASTar (Lasergene) Software analysiert.

II.5 Zellbiologische Methoden

II.5.1 Kultivierung von Zellkulturen

Eingesetzte Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen in R-10 Medium kultiviert und zweimal wöchentlich passagiert. Adhärenz wachsende Zellen wurden dazu einmal mit sterilem PBS (Invitrogen) gewaschen und durch Inkubation mit 2 ml Tryple-Express (Invitrogen) vom Flaschenboden abgelöst. Nach 5-10 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml R-10 gestoppt und die Zellen konnten in einem Splittverhältnis von 1:5 bis 1:10 mit frischem R-10 Medium versetzt werden. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ und erhöhter Luftfeuchtigkeit im Brand Inkubator.

II.5.2 Transfektion von HEK293T Zellen

Am Tag vor der Transfektion wurden 1×10^5 Zellen pro Well in einer 12-Well Platte ausgesät und 16-24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Transfektion mit pMS RIII bzw. pMS RGFPMH

erfolgte mittels Roti-fect Lipofektionsagenz (Roth) nach Angaben des Herstellers unter Einsatz von 1 µg Plasmid-DNA und 4 µl Roti-fect pro Transfektionsansatz. Drei Tage nach Transfektion wurden die Zellen in eine T25-Flasche in Selektionsmedium (R-10, 100 µg/ml Zeocin) überführt. Der Selektionsdruck wurde für mindestens vier Wochen aufrechterhalten und danach auf 50 µg/ml Zeocin reduziert.

II.5.3 Zytotoxizitätstest

Die zytotoxische Wirkung des Immuntoxins scFv35-ETA' (II.3.9) wurde im XTT-Proliferationstest untersucht. Dazu wurden für jede Zelllinie 5×10^3 Zellen pro Well einer 96-Well Mikrotiterplatte in 50 µl R-10 Medium ausplattiert und zur Anheftung der Zellen 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Das Immuntoxin wurde in einer seriellen 1:5 oder 1:3 Verdünnungsreihe in 50 µl Aliquots im Dreifachansatz hinzugegeben und die Platte für weitere 72 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl XTT/Phenanzin Methosulfat-Gemisch (1 mg/ml XTT, 15,3 µg/ml PES) und erneute Inkubation für 3-4 Stunden konnte die Farbumbsetzung des chromogenen Substrats bei einer Wellenlänge von 450 nm abzüglich der Referenzwellenlänge von 630 nm im ELISA-Reader gemessen werden. Zusätzlich wurde ein kompetitiver Ansatz durchgeführt. Hierfür wurden zu einer konstanten Immuntoxinkonzentration von 1,5 nM verschiedene Konzentrationen (1,5, 15 und 150 nM) eines scFv35-Kontrollproteins ohne toxische Komponente gegeben (SNAP-scFv35). Die graphische Auswertung und Bestimmung der IC_{50} -Werte (Konzentration, bei der eine 50%ige Reduktion der Viabilität erreicht wird) erfolgte mittels GraphPad Prism Software.

II.5.4 Apoptose-Test mittels Annexin-V-Bindung

Der durchgeführte Apoptose-Test basiert auf der spezifischen kalziumabhängigen Bindung von Annexin V an Phosphatidylserin, welches bei der Apoptose von der Innen- an die Außenseite der Zellmembran umgelagert wird. Dazu wurden 1×10^5 Zellen pro Well einer 12-Well Platte gegeben und mit 1 µg/ml Immuntoxin in R-10 Medium 12, 24 und 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen vorsichtig durch Trypsinierung aus den Vertiefungen gelöst und zusammen mit dem Überstand im Dade Serotec Zellwaschgerät mit PBS gewaschen. Die Detektion des Apoptosemarkers Phosphatidylserin erfolgte durch Inkubation der Zellen mit 450 µl Überstand Annexin V-GFP produzierender HEK293T Zellen [96], der mit 50 µl kalziumhaltigen 10x Annexin V Bindepuffer versetzt wurde. Nach 15minütiger Inkubation wurden die Zellen erneut gewaschen und mit 300 µl 1x Annexin V Bindepuffer mit 1 µg/ml Propidiumiodid (PI) versetzt. Die gleichzeitige PI-Färbung erlaubt die Unterscheidung nekrotischer bzw. toter Zellen von lebenden und apoptotischen Zellen. In der der späten Apoptose kommt es zu

einer Doppelfärbung. Die Messung erfolgte im FACS Calibur und wurde mit WinMDI ausgewertet.

10x Annexin V Bindepuffer, pH 7,4

| | |
|--------|-------------------|
| 100 mM | HEPES |
| 1,4 M | NaCl |
| 25 mM | CaCl ₂ |

II.5.5 Internalisierungs-Test

Die Untersuchung der Internalisierung erfolgte mittels Durchflusszytometrie nach der von Cizeau *et al.* beschriebenen Methode [97]. 5×10^5 Zellen pro Ansatz wurden mit $1 \mu\text{g}$ Immuntoxin in $100 \mu\text{l}$ PBS, 0,5% (w/v) BSA für eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschrift in PBS erfolgte die Inkubation der Zellen in R-10 Medium bei 37°C . Zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 15, 30, 60, 120 und 240 min) wurde jeweils eine Probe wieder auf Eis gestellt um die Internalisierung zu stoppen. Die Messung des noch an der Zelloberfläche befindlichen Immuntoxins wurde wie in Kapitel II.3.5 beschrieben durchgeführt. Zur Auswertung wurde der Median der Fluoreszenzintensität über die Zeit dargestellt. Als Referenz galt die bei 4°C inkubierte Probe (100% Kontrolle). Die Sekundärantikörperkontrolle diente als Nullwert.

II.5.6 Bestimmung der funktionalen Affinitäten von scFv35-ETA'

Die Bestimmung der funktionalen Affinität erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die Zellen wurden dazu mit einer Verdünnungsreihe des Immuntoxins für eine Stunde auf Eis inkubiert. Die Messung sowie die Vorbereitung der Zellen erfolgte wie unter Kapitel II.3.5 beschrieben. Die Auswertung und Bestimmung der K_d wurde mit Hilfe der nicht-linearen Regressions-Analyse in GraphPad Prism durchgeführt.

II.5.7 Kryokonservierung von Zellkulturen

Dazu wurden pro Ansatz ca. 5×10^6 Zellen mit hoher Vitalität abzentrifugiert (250 g, 5 min), in 1 ml kaltem Einfriermedium aufgenommen und in 2 ml Kryoröhrchen (Roth) überführt. Die Kryoröhrchen wurden einige Minuten auf Eis und mindestens eine Stunde bei -20°C gehalten bevor sie bei -80°C zwischengelagert wurden um ein langsames Einfrieren zu gewährleisten. Die Endlagerung erfolgte bei -150°C . Das Einfriermedium setzte sich aus R-10 Medium mit insgesamt 20% (v/v) FKS und 10% (v/v) DMSO zusammen.

III ERGEBNISSE

III.1 Monoklonale anti-RAI3 Antikörper

Aufgrund der besonderen Bedeutung von RAI3 als potentielles neues tumorassoziiertes Antigen, sollten mAk gegen RAI3 in Rahmen dieser Arbeit generiert werden. Mittels Hybridomatechnik konnten fünf monoklonale anti-RAI3 Antikörper isoliert und auf ihre spezifischen Bindeeigenschaften hin charakterisiert werden. Dazu wurden verschiedene ELISA-Varianten, durchflusszytometrische Messungen sowie Western Blot-Analysen von Zell- und Gewebelysaten angewandt. Da eine Bindung an die Oberfläche von RAI3-positiven Zellen nicht nachgewiesen werden konnte, wurde eine weitere Untersuchung hinsichtlich der diagnostischen Einsatzmöglichkeiten der Antikörper angestrebt. Dazu erfolgten immunhistochemische Untersuchungen an Mammakarzinom-Gewebeproben.

III.1.1 Immunisierung von BALB/c Mäusen

Durch die Kooperation mit M-Fold Biotech konnte auf rekombinantes RAI3-Protein zugegriffen werden, das mittels patentierter M-Fold Technologie in *E.coli* produziert und nach der Reinigung in Liposomen integriert wurde. Diese Technologie erlaubt die stabile Faltung des Rezeptors in seiner natürlichen Form als membranständiger GPCR. Die Analyse des Proteins mittels SDS-PAGE (II.3.2) zeigte das gereinigte Protein mit einem Molekulargewicht von ca 35 kDa, welches ca 5 kDa unterhalb des theoretischen Molekulargewichtes (40 kDa) liegt. Aufgrund seiner stark hydrophoben Bereiche in den Transmembrandomänen konnten auch Dimere (ca. 70 kDa) und hochmolekulare Polymere (>150 kDa) detektiert werden (Abbildung III-1).

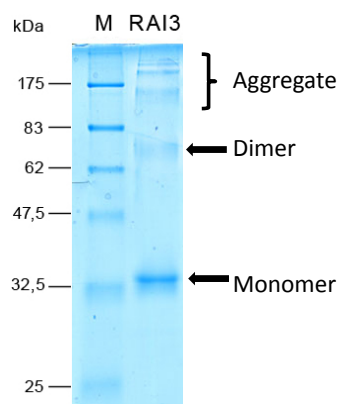


Abbildung III-1 SDS-PAGE des Antigens RAI3.

Zur Immunisierung eingesetztes RAI3 in Liposomen (II.1.7) wurde mittels SDS-PAGE in einem 12%igen Gel aufgetrennt und mittels Coomassie-Färbung visualisiert (II.3.2). Pfeile kennzeichnen monomeres RAI3 (ca 35 kDa) sowie dimeres Protein (ca. 70 kDa). Die geschweifte Klammer kennzeichnet den Bereich der Aggregate.

Das analysierte Protein wurde zur Immunisierung von drei BALB/c Mäusen (II.2.1) eingesetzt, die sich an unter Abbildung III-2 dargestelltes zeitliches Schema hielt. Um einen optimalen Immunisierungserfolg zu gewährleisten wurden verschiedene Antigenmengen zur Immunisierung eingesetzt. Dabei erzielte die höchste Konzentration an RAI3 die besten Immunisierungsergebnisse. Die Erstimmunisierung erfolgte mit 100 µg RAI3 und GERBU Adjuvanz, welches speziell für die Immunisierung von Mäusen entwickelt wurde. Für die „Boost“-Injektionen wurden 50 µg RAI3 eingesetzt. Vor und während der Immunisierung wurden regelmäßig Blutproben entnommen.

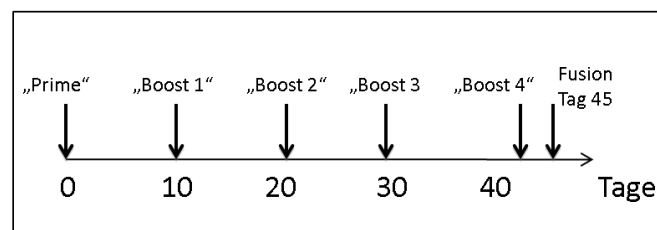


Abbildung III-2 Schema des zeitlichen Ablaufs der RAI3-Immunisierung.

Die Immunisierung von BALB/c Mäusen (II.2.1) mit RAI3 (II.1.7) wurde mit einer Erstimmunisierung („Prime“) und 4 nachfolgenden „Boost“-Injektionen im Intervall von ca. 10-12 Tagen durchgeführt. Die Fusion erfolgte zwei Tage nach der letzten Immunisierung.

Zur Beobachtung des Immunisierungserfolges wurden die Blutproben mittels ELISA (II.3.1.1) auf die Entwicklung des RAI3-spezifischen Antikörpertiters untersucht. Dazu wurden serielle Verdünnungsreihen auf die Bindung an RAI3 untersucht und mittels IgG-spezifischen GAM^{PO} Antikörper detektiert. Als Antikörpertiter wurde diejenige Verdünnungsstufe angenommen, die im ELISA eine Extinktion von mindestens dem zweifachen Wert des Hintergrundsignals ergaben und wurde auf $E_{405\text{ nm}} \geq 0,15$ festgelegt.

Zehn Tage nach der ersten Immunisierung konnte noch kein spezifischer Antikörpertiter detektiert werden (Abbildung III-3). Bereits nach der zweiten Immunisierung war eine erste Immunantwort messbar. Der Titer lag hier bei ca. 1:2.000. Nach einer weiteren „Boost“-Injektion konnte dieser deutlich gesteigert werden und lag nach 30 Tagen bei ca. 1:32.000. Nach einer weiteren Injektion konnte der spezifische Antikörpertiter bis zum Tag der Fusion (Tag 45) auf über 1:100.000 gesteigert werden. Damit waren optimale Grundvoraussetzungen für eine erfolgreiche Fusion und Generierung monoklonaler anti-RAI3 Antikörper erfüllt.

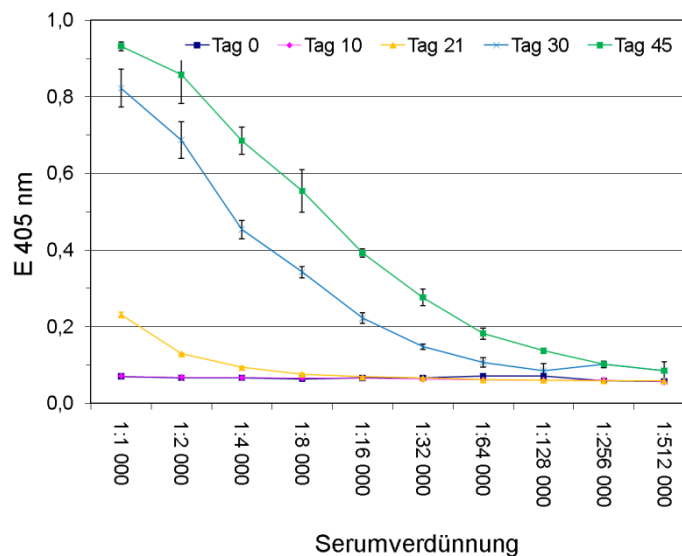


Abbildung III-3 ELISA zur Bestimmung des RAI3-spezifischen Antikörpertiters im Mausserum.

Für die Titerbestimmung (II.3.1.1) wurden Mikrotiterplatten mit 50 ng RAI3 (pro Well in PBS beschichtet und serielle Verdünnungen des Mausserums (II.2.1, hier exemplarisch für Maus 3) inkubiert. Das Mausserum wurde vor (Tag 0) und zu verschiedenen Zeitpunkten während der Immunisierung (Tage 10, 21, 30) und am Tag der Fusion (Tag 45) für diese Analyse entnommen. Die Detektion erfolgte mittels GAM^{PO} und ABTS als Substrat. Dargestellt sind die mittleren Extinktionswerte von Triplikaten nach einstündiger Substratinkubation.

III.1.2 Herstellung Antikörper produzierender Hybridomzellen

Am Tag der Fusion wurden die Milzen der erfolgreich immunisierten Mäuse entnommen und mit murinen Myelomzellen fusioniert (II.2.2). Die fusionierten Zellen wurden auf 96-Well-Mikrotiterplatten ausplattiert und in HAT-Selektionsmedium kultiviert. Nach zwölf Tagen erfolgte die erste Analyse der Überstände auf RAI3-bindende polyklonale Antikörper mittels ELISA (II.3.1.2). Es konnten insgesamt zehn positive polyklonale Hybridomen identifiziert werden, die durch limitierende Verdünnungen zu monoklonalen Kolonien vereinzelt wurden. Dabei wurden jene Klone ausgewählt, bei denen im ELISA nach einer Stunde der Substratentwicklung eine $E_{405\text{ nm}} \leq 1$ gemessen wurde und kein Signal auf BSA-beschichteten Platten detektiert wurde. Nach insgesamt drei Runden konnten fünf mAks generiert werden, die eine spezifische Bindung an RAI3 zeigten.

III.1.3 Spezifische Antigenbindung der anti-RAI3 Antikörper

Zur weiteren Untersuchung der Spezifität der Antikörperbindung wurde auch die Kreuzreaktivität gegenüber anderen Kontrollproteinen mittels ELISA (II.3.1.2) untersucht (Abbildung III-4). Da das rekombinante Protein einen His₆-Tag enthielt, wäre auch eine RAI3-unspezifische His₆-Tag Bindung der mAks denkbar. Dies konnte durch den Einsatz von

Kontrollproteinen mit His₆-Tag ausgeschlossen werden. Als Kontrollproteine wurden daher neben BSA die zur Verfügung stehenden Proteine CD30Ligand (CD30L) und GPR30 eingesetzt. CD30L ist ein rekombinant hergestelltes Protein, das nicht mit RAI3 verwandt ist, jedoch ebenfalls einen His₆-Tag enthält. GRP30 ist genau wie RAI3 ein GPCR, der ebenfalls von der Firma M-Fold Biotech zur Verfügung gestellt wurde und auf die gleiche Weise wie RAI3 hergestellt wurde. Keiner der mAKs zeigte in diesem Versuch eine Kreuzreaktivität auf den Kontrollproteinen, was die Spezifität der mAKs gegen RAI3 bestätigt (Abbildung III-4). Weiterhin zeigten die mAKs eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit des Signals im ELISA. Dazu wurde das Antigen in verschiedenen Konzentrationen beschichtet (0,3 bis 200 ng pro Well). Zwei der fünf getesteten Überstände detektierten dabei Proteinmengen von nur 3 ng Protein.

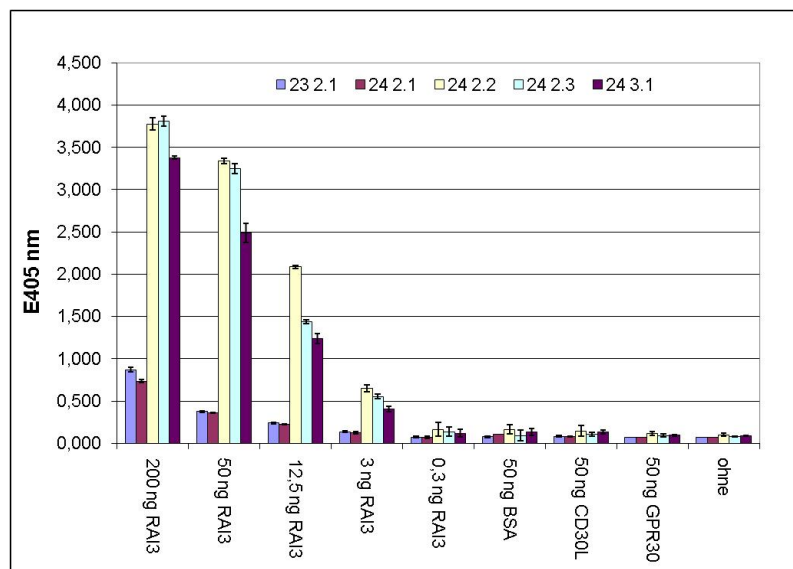


Abbildung III-4 Demonstration der spezifischen Antigenbindung der Hybridomaüberstände.

Variierende Konzentrationen des Antigens RAI3 (0,3-200 ng pro Well) (II.1.7) und die Kontrollproteine BSA, CD30Ligand (CD30L) und GPR30 (je 50 ng pro Well) wurden auf eine Mikrotiterplatte beschichtet. Überstände der Hybridomen (II.2.3), die die mAKs 23 2.1, 24 2.1, 24 2.2, 24 2.3 und 24 3.1 produzieren wurden auf ihre spezifische RAI3-Bindung und Kreuzreaktivität gegenüber der Kontrollproteine im ELISA (II.3.1.2) untersucht. Die Detektion erfolgte mittels GAM^{PO} und ABTS als Substrat. Dargestellt sind die mittleren Extinktionswerte von Triplikaten nach einstündiger Substratinkubation.

III.1.4 Bestimmung des Ig-Isotyps der monoklonalen Antikörper

Die Bestimmung des Ig-Isotyps wurde mittels ELISA und dem BD Isotyping Kit durchgeführt (II.3.1.4). Dieser basiert auf der spezifischen Detektion der Antikörperisotypen der schweren und der leichten Kette der mAK direkt aus dem Kulturüberstand. Bei allen fünf Antikörpern konnte die leichte Kette dem Isotyp kappa zugeordnet werden, der bei Mäusen mit 95% hauptsächlich vorkommt. Die schweren Ketten waren bei vier der mAKs vom Isotyp IgG1 und bei einem vom Isotyp IgG3. Tabelle III-1 zeigt eine Übersicht der Antikörperisotypen.

Tabelle III-1 Übersicht der Isotypenbestimmung der monoklonalen anti-RAI3 Antikörper (II.3.1.4).

| Antikörper | Isotyp | |
|-------------------|----------------------|----------------------|
| | schwere Kette | leichte Kette |
| 23 2.1 | IgG3 | kappa |
| 24 2.1 | IgG1 | kappa |
| 24 2.2 | IgG1 | kappa |
| 24 2.3 | IgG1 | kappa |
| 24 3.1 | IgG1 | kappa |

Nach erfolgreicher Vereinzelung der Hybridomen und Demonstration der Spezifität der mAKs sowie Isotypisierung erfolgte die Reinigung der Antikörper aus den Hybridomaüberständen

III.1.5 Reinigung der monoklonalen anti-RAI3 Antikörper

Basierend auf den Ergebnissen der Isotypisierung wurde die Reinigung der mAKs über eine Protein G Affinitätschromatographie durchgeführt (II.3.8). Monoklonale Hybridomen wurden dafür an serumfreies Medium adaptiert, um die gleichzeitige unerwünschte Ko-Reinigung boviner Antikörper, die ebenfalls eine hohe Affinität zu Protein G aufweisen, zu verhindern. Gereinigte mAK wurden direkt nach der Reinigung in PBS umgepuffert (II.3.10). Die Analyse mittels SDS-PAGE (II.3.2) und Western Blot (II.3.3) zeigte einen hohen Reinheitsgrad der Antikörper von >95 %. Unter den reduzierenden Bedingungen lagen die leichte (25 kDa) und die schwere Kette (50 kDa) getrennt voneinander vor (Abbildung III-5). Die schwere Kette konnte dabei im Western Blot mittels Fc-spezifischen Antikörpers sowohl in der Elutionsfraktion als auch im Kulturüberstand des entsprechenden Hybridomaklons detektiert werden. Vier der mAKs konnten erfolgreich gereinigt werden. Lediglich der mAK 23 2.1 des Isotyps IgG3 konnte mit keiner zufriedenstellenden Ausbeute über diese Methode gereinigt werden, da IgG3 eine zu geringe Affinität gegenüber Protein G aufweist. Die weiteren Analysen wurden daher nur mit den mAbs 24 2.1, 24 2.2, 24 2.3 und 24 3.1 durchgeführt.

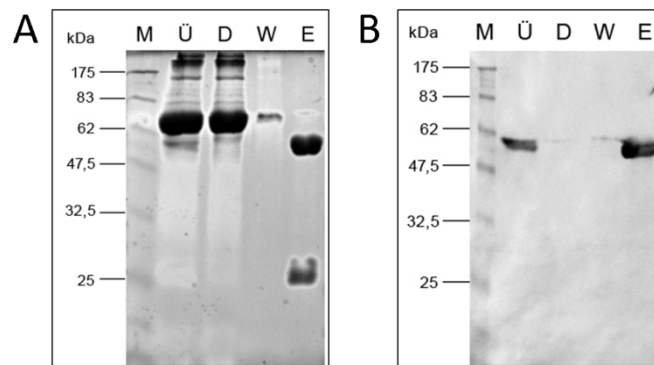


Abbildung III-5 SDS-PAGE und Western Blot-Analyse der Protein G Reinigung exemplarisch dargestellt für mAk 24 2.1.

Die Reinigung der mAks (II.2.3, II.3.8) wurde mittels SDS-PAGE (II.3.2) und Western Blot-Analyse (II.3.3) dokumentiert. **A:** SDS-PAGE der Proben M: Prestained Protein Marker; Ü: Zur Reinigung eingesetzter Überstand der Hybridomakultur; D: Durchflussprobe nach Protein G Säule; W: Probe der Waschfraktion; E: Elutionsfraktion umgepuffert in PBS. **B:** Westernblot der gleichen Proben wie bei A. Detektion erfolgte über einen Fc-spezifische GAM^{AP} und NBT/BCIP als Substrat.

Die gereinigten mAk konnten daraufhin mittels Bradford Proteinbestimmung (II.3.11.1) quantifiziert werden. Diese ergab Proteinausbeuten von 15 bis 38 mg pro Liter Hybridomaüberstand. Die gereinigten Antikörper wurden im Folgenden für die weitere Charakterisierung eingesetzt.

III.1.6 Kompetitiver ELISA und Affinitätsbestimmung der monoklonalen anti-RAI3 Antikörper

Die gereinigten mAks sollten zur funktionalen Charakterisierung auf ihre Antigen-Affinitäten untersucht werden. Da eine Analyse mittels Biacore aufgrund der stark hydrophoben Eigenschaften des Proteins RAI3 und der damit verbundenen unspezifischen Bindung des Antigens an die Matrix der Messzelle nicht möglich war, wurde eine Affinitätsbestimmung mittels ELISA durchgeführt (II.3.1.3). Dazu wurde ein kompetitiver ELISA durchgeführt. Die dadurch induzierte Signalunterdrückung demonstriert die Bindung der Antikörper an das Antigen in Lösung (Abbildung III-6). Nach Einstellen eines Gleichgewichts konnten die verbleibenden freien Antikörper an die Festphase gebunden und detektiert werden.

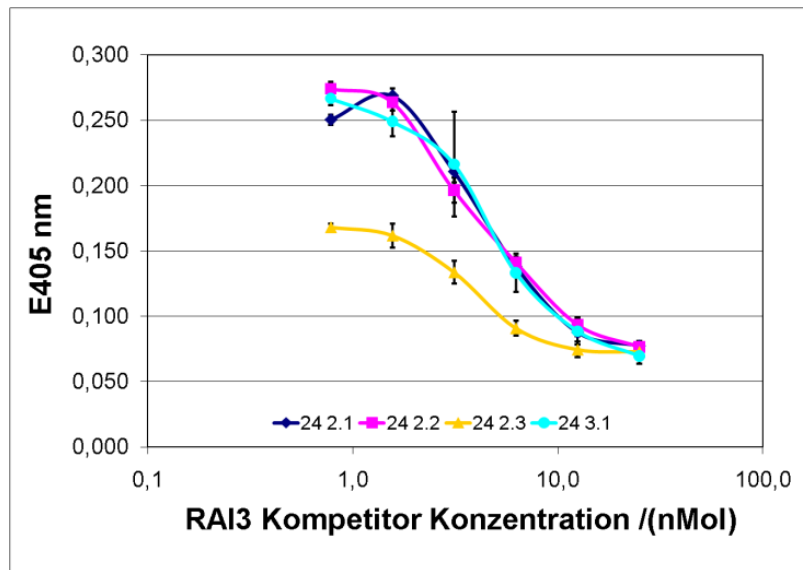


Abbildung III-6 Kompetitiver ELISA der monoklonalen anti-RAI3 Antikörper.

Anti-RAI3 Antikörper (II.2.3, II.3.8) wurden mit konstanter Konzentration mit einer Verdünnungsreihe des Antigens RAI3 (II.1.7) vorinkubiert. Ungebundene Antikörper in Lösung wurden im Anschluss durch Inkubation auf RAI3-beschichteten Mikrotiterplatten detektiert. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte mittels GAM^{PO} und ABTS als Substrat im ELISA (II.3.1.3). Dargestellt sind die mittleren Extinktionswerte von Triplikaten nach einstündiger Substratinkubation.

Durch diese indirekte Messung des Antigen-Antikörper-Komplexes in Lösung konnte nach Friguet *et al.* [89] die Affinitäten der mAks bestimmt werden. Dabei zeigten alle mAks vergleichbare Affinitäten im nanomolaren Bereich (Tabelle III-2).

Tabelle III-2 Übersicht Affinitäten der anti-RAI3 Antikörper (II.3.1.3).

| Antikörper | KD-Wert [nM] |
|------------|--------------|
| 24 2.1 | 2,2 ± 0,4 |
| 24 2.2 | 1,8 ± 0,9 |
| 24 2.3 | 2,3 ± 0,3 |
| 24 3.1 | 2,7 ± 1,2 |

Neben der spezifischen Bindung des rekombinanten Antigens sollte im Folgenden die Bindung der Antikörper an die Zelloberfläche untersucht werden.

III.1.7 Bindung der anti-RAI3 Antikörper an Tumorzellen

Für einen möglichen therapeutischen Einsatz der anti-RAI3 mAks ist nicht nur die spezifische Antigenbindung, sondern auch die Bindung an der Zelloberfläche Antigen-positiver Zellen eine wesentliche Grundvoraussetzung. Um dies zu überprüfen standen Zelllinien zur Verfügung, die laut Literatur bzw. nach Untersuchung auf RNA-Ebene RAI3-positiv sind. Die

Zelllinie ASPC-1 ist eine in der Literatur ausführlich beschriebene Zelllinie des Pankreaskarzinoms, die eine erhöhte Expression von RAI3 zeigt [46]. Die Zelllinie MDA-MB-231 wurde von unserem Kooperationspartner am Uniklinikum Aachen auf RNA-Ebene auf ihre RAI3 Expression untersucht und zeigte dabei ein positives Ergebnis (Daten nicht gezeigt). In einer Reihe von durchflusszytometrischen Untersuchungen (II.3.5) wurden die Zelllinien mit den generierten Antikörpern inkubiert und mittels Fluoreszenzmarkergekoppelten Sekundärantikörpern ein Nachweis der Zelloberflächenbindung angestrebt. In keinem dieser Experimente, in denen die Konzentrationen des Antikörpers variiert wurden, konnte eine spezifische Bindung der mAKs an die ausgewählten Zelllinien demonstriert werden (Abbildung III-7).

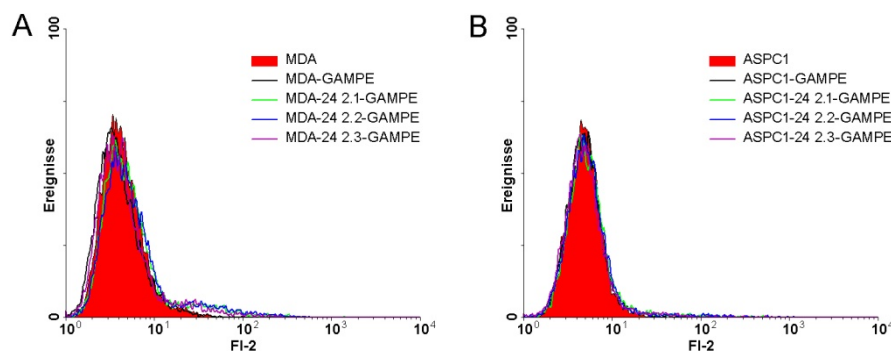


Abbildung III-7 Bindungsanalyse der anti-RAI3 Antikörper an Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 (A) und Pankreaszelllinie ASPC-1 (B).

1×10^5 Zellen der jeweiligen Zelllinie wurden mit einer 1:50 Verdünnung der gereinigten mAKs (II.2.3, II.3.8) (hier dargestellt für 24 2.1, 24 2.2 und 24 2.3) 30 min auf Eis inkubiert. Die Bindung wurde anschließend mit einer 1:40 Verdünnung des Sekundärantikörpers GAM^{PE} mittels Durchflusszytometrie (II.3.5) im FACS Calibur detektiert. Die Auswertung erfolgte mittels WinMDI. MDA: MDA-MB-231.

III.1.8 Analyse der RAI3 Expression in Zelllysaten getesteter Zelllinien

Da die Bindungsanalysen keinen Erfolg zeigten, sollten Zelllysate im Western Blot (II.3.3.1) analysiert werden. Dabei sollte untersucht werden, ob eine spezifische Detektion von RAI3 mit Hilfe der neu generierten mAKs im Zelllysate möglich ist. Dazu wurden die getesteten Zelllinien sowie die Kontrollzelllinie HEK293T lysiert (II.3.4) und das Zelllysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Der Blot wurde durch Inkubation mit mAk 24 2.1 und Sekundärantikörper GAM^{HRPO} detektiert. Als Substrat wurde dabei ECL eingesetzt, da dieses eine wesentlich höhere Sensitivität als präzipitierende Substrate aufweist. Zur Kontrolle diente ein direkt Peroxidase-gekoppelter anti- β -actin Antikörper (Abbildung III-8).

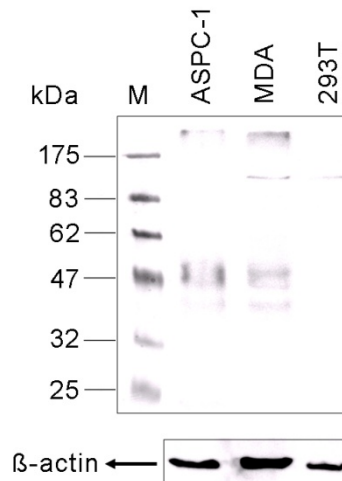


Abbildung III-8 Western Blot-Analyse von Zelllysaten der RAI3-positiven Zelllinien MDA-MB-231 und ASPC-1 und HEK293T als Negativkontrolle.

Zelllysate (II.3.3.1) der Zelllinien ASPC-1, MDA-MB-231 (MDA) und HEK293T (293T) wurden elektrophoretisch aufgetrennt (II.3.2) und im Western Blot (II.3.3.1) durch Inkubation mit anti-RAI3 mAk 24 2.1 (1:1000) (II.2.3, II.3.8) und Sekundärantikörper GAM^{HRPO} (1:5000) detektiert. Als Kontrolle diente ein HRPO-gekoppelter anti-β-actin Antikörper. Als Substrat diente ein ECL Substrat. Die Substratentwicklung erfolgte für 20 Minuten im LAS-Imager (Fujifilm). Weißlicht und Chemilumineszenz-Signal wurden anschließend in Adobe Photoshop zusammengefügt.

In beiden RAI3-positiven Zelllinien konnten Banden in Höhe von ca. 47 kDa detektiert werden. Diese liegt zwar deutlich über der theoretischen Proteingröße (40 kDa), lässt sich jedoch durch möglicherweise starke Glykosylierung in eukaryotischen Zelllinien erklären. In der RAI3-negativen Zelllinie HEK293T konnte diese Bande nicht detektiert werden, was auf eine spezifische Detektion hinweist.

III.1.9 Analyse der RAI3 Expression in Gewebelysaten

Neben der Detektion von RAI3 in Zelllysaten wurden ebenfalls Mammakarzinom-Gewebelysate im Western Blot analog zu Kapitel III.1.8 untersucht. Durch die Kooperation mit dem Pathologischen Institut am Uniklinikum Aachen (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Edgar Dahl, RWTH Aachen) konnte auf Gewebelysate von sechs Krebspatienten für diese Analyse zugegriffen werden. Dabei konnte bei drei der sechs untersuchten Proben deutliche, jedoch sehr breite Banden in Höhe von ca 47 kDa detektiert werden (Abbildung III-9; vergl. Abbildung III-8). Bei zwei weiteren konnten nur sehr schwache Banden, bei einer Probe gar keine Banden detektiert werden. Zusätzlich wurde bei den positiven Lysaten noch eine weitere Bande bei ca. 35 kDa detektiert. Denkbar wäre die Detektion unglykosylierten Proteins, dass noch nicht posttranslational modifiziert wurde, oder aber ein Spaltprodukt von RAI3, welches durch proteolytische Spaltung entstanden ist und die spezifische Bindestelle des Antikörpers enthält.

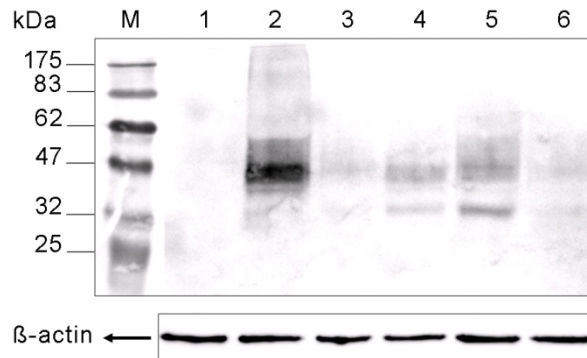


Abbildung III-9 Western Blot-Analyse von Lysaten aus Mammakarzinom-Geweben.

Lysate von Mammakarzinom-Geweben (1-6) (II.3.4) wurden elektrophoretisch aufgetrennt (II.3.2) und im Western Blot (II.3.3.1) durch Inkubation mit anti-RAI3 mAk 24 2.1 (1:1000) (II.2.3, II.3.8) und Sekundärantikörper GAM^{HRPO} (1:5000) detektiert. Als Kontrolle diente ein HRPO-gekoppelter anti-β-actin Antikörper. Als Substrat diente ein ECL Substrat. Die Substratentwicklung erfolgte für 20 Minuten im LAS-Imager (Fujifilm). Weißlicht und Chemilumineszenz-Signal wurden anschließend in Adobe Photoshop zusammengefügt.

Obwohl die Bandenintensität der β-actin-Kontrolle eine gleichmäßige Proteinauftragung bestätigte, konnten starke Unterschiede in der Bandenintensität der detektierten Banden mittels anti-RAI3 mAk festgestellt werden. Dies weist auf eine starke Variation der RAI3-Expression beim Mammakarzinom hin.

III.1.10 Herstellung RAI3-transfizierter HEK293T Zellen

Da die bisherigen Untersuchungen an Zell- und Gewebelysaten zwar deutliche Hinweise für eine spezifische Detektion von RAI3 zeigten, jedoch kein ganz eindeutiges Ergebnis erzielt werden konnte, sollte ein Modellsystem generiert werden, das eine spezifische und eindeutige Analyse ermöglicht. Dazu wurden HEK293T Zellen, die bereits in der Western Blot-Analyse als RAI3-negativ identifiziert wurden (Abbildung III-8), mit RAI3 Expressionsplasmiden transfiziert (II.5.2). Die kodierende Sequenz für RAI3 konnte aus den von der Firma M-Fold Biotech zur Verfügung gestellten bakteriellen Expressionsplasmid mittels PCR amplifiziert werden. Dabei wurden die eingesetzten Primer so generiert, dass eine direkte Klonierung über die Restriktionsschnittstellen *NheI* und *NotI* in bereits vorhandene Plasmide zur eukaryotischen Expression unter dem CMV Promotor erfolgen konnte. Für eine optimale Expression wurde über den 5'-Primer eine Kozak Konsensus-Sequenz (GCCACC) direkt vor das RAI3 Start Codon eingefügt. Die generierten Plasmide erlaubten so die Expression von RAI3 alleine (pMS R III) oder in Fusion mit GFP (pMS R GFPMH) jeweils ohne Ig-kappa-Leader Sequenz (Abbildung III-10), um eine sekretorische Prozessierung des Protein zu verhindern und es intrazellulär vorliegen zu haben. Das Plasmid pMS R III ermöglicht die Kontrolle der Expression über die bicistronische Expression von eGFP über eine IRES (interne ribosomale Eintrittsstelle)-Sequenz. HEK293 T Zellen

wurden mit den so generierten Plasmiden über Lipofektion transfiziert und durch Inkubation in Zeozin-haltigem Selektionsmedium über einen Zeitraum von 14 Tagen selektiert und expandiert. Die Kontrolle der Expression erfolgte mikroskopisch über die eGFP Expression entweder als direkter Fusionspartner oder als bicistronisch exprimiertes Protein.

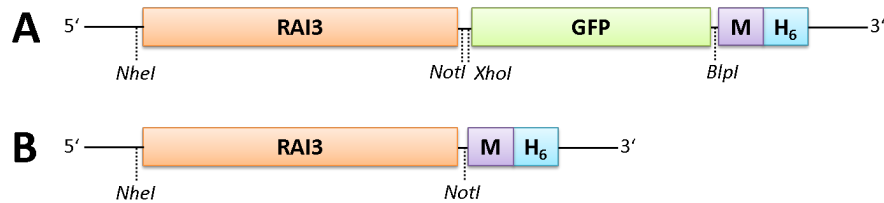


Abbildung III-10 Schema der Expressionskassetten von RAI3 (A) und RAI3-GFP (B).

Für die Transfektion (II.5.2) von HEK293T Zellen wurden die Expressionsplasmide pMS R II (A) für die Expression von RAI3 mit bicistronischem eGFP als Reporter gen und pMSRGFP MH (B) für die Expression von RAI3 in direkter Fusion an eGFP kloniert. Über die Restriktionsschnittstellen NheI und NotI erfolgte die Integration in den Vektor. Beide Konstrukte enthielten C-terminal einen His6-Tag (H6) und einen c-Myc-Tag (M).

III.1.10.1 Bindung der anti-RAI3 Antikörper an RAI3-transfizierte Zellen

Nachdem mittels Durchflusszytometrie bisher keine Bindung der Antikörper auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden konnte (vergl. III.1.7), sollte dies unter Einsatz der RAI3-transfizierten HEK293T Zellen erneut untersucht bzw. bestätigt werden. Dazu wurden RAI3-transfizierte (pMS R III) HEK293T Zellen im Vergleich zu untransfizierten HEK293T Zellen eingesetzt. Aufgrund der bicistronischen Koexpression von eGFP in den transfizierten Zellen konnten diese anhand ihrer grünen Ausgangsfluoreszenz im FL1 bereits deutlich voneinander unterschieden werden (Abbildung III-11, Dotplots). Daher konnte auch davon ausgegangen werden, dass eine funktionale RA3 Expression in den transfizierten Zellen vorlag. Allerdings konnte erneut keine eindeutige Bindung der Antikörper an die Zelloberfläche der transfizierten Zellen nachgewiesen werden (Abbildung III-11).

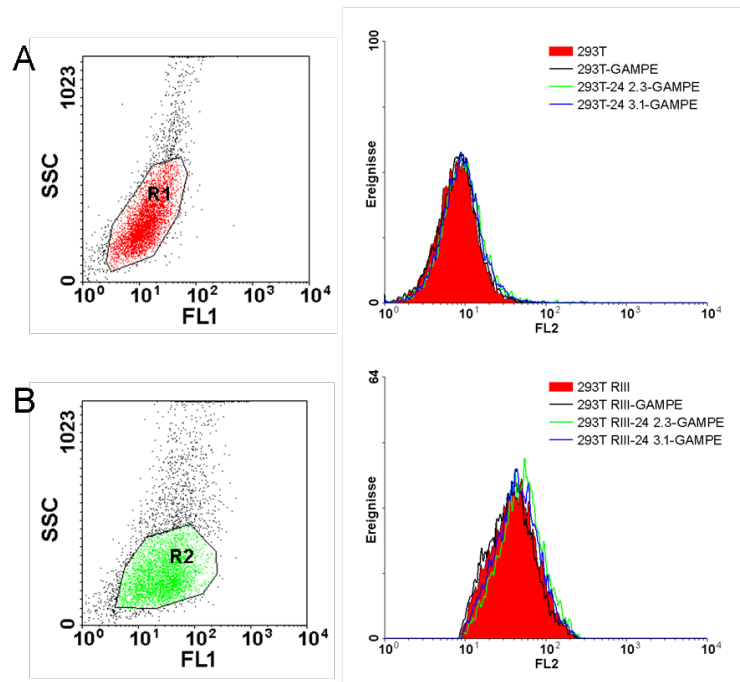


Abbildung III-11 Kontrolle der erfolgreichen RAI3-Expression mittels GFP Reporter-Gen (Dotplots) und Bindungsanalyse der anti-RAI3 Antikörper an RAI3-transfizierte HEK293T Zellen (Histogramme).

RAI3-Expressionsanalyse der transfizierten HEK293T Zellen (II.5.2) (B) im Vergleich zu untransfizierten Zellen (A) im Dotplot. R1 und R2 begrenzen die zur Bindungsanalyse berücksichtigte Zellpopulation. Für die Bindungsanalyse wurden 1×10^5 Zellen RAI3-transfizierter (B) und nicht-transfizierter HEK293T Zellen (A) mit einer 1:50 Verdünnung der gereinigten mAks (II.2.3, II.3.8), hier dargestellt für 24 2.3 und 24 3.1, 30 min auf Eis inkubiert. Die Bindung wurde anschließend mit einer 1:40 Verdünnung des Sekundärantikörpers GAM^{PE} mittels Durchflusszytometrie (II.3.5) im FACS Calibur detektiert. 293T: HEK293T, RIII: transfizierte HEK293T (Plasmid pMS RIII).

III.1.10.2 Analyse der RAI3 Expression in Zelllysaten transfizierter Zellen

Da im Modellsystem aus RAI3-transfizierten Zellen keine Bindung der mAks an die Zelloberfläche in der Durchflusszytometrie demonstriert werden konnte, wurde ebenfalls eine Western Blot-Analyse der Zelllysate (II.3.3.1) durchgeführt, um hier die eindeutige Spezifität der Antikörperbindung zu bestätigen. Neben den beschriebenen transfizierten Zellen für die RAI3 und die RAI3-GFP Expression wurden auch transfizierte Kontrollzelllinien eingesetzt, die die gleichen Vektoren jedoch mit nicht relevantem Gen enthielten. Im Rahmen anderer Projekte standen dazu zum Einen transfizierte 293T Zellen mit dem Plasmid pMS H22Ki4 III als Kontrolle für pMS R III und zum Anderen Zellen mit pMS AVGFP MH als Kontrolle für pMS RGFP MH zur Verfügung. Auf diese Weise ist bei der Analyse sichergestellt, dass detektierte Bandenmuster nicht allein auf die Transfektion oder das inserierte Plasmid zurückzuführen ist. Die Analyse aller Zelllysate im Western Blot demonstrierte einen eindeutigen Zusammenhang zwischen detektiertem Signal und transfiziertem Plasmid. Nur in den RAI3 bzw. RAI3-GFP transfizierten Zellen wurde ein deutliches Bandenmuster

detektiert. Die Kontrolle mit β -actin Antikörper zeigte dabei einen gleichmäßigen Probenauftrag (Abbildung III-12).

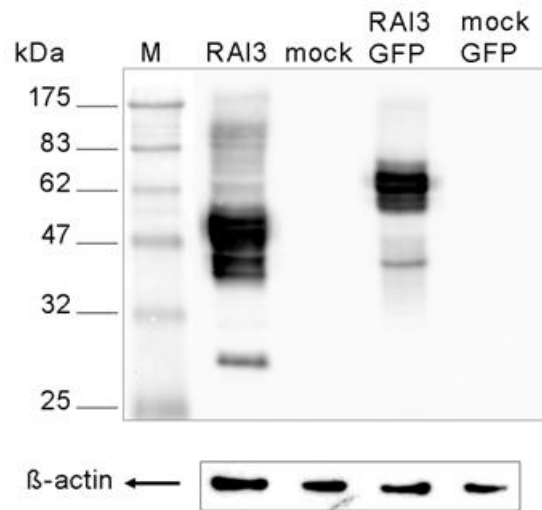


Abbildung III-12 Western Blot-Analyse von Zelllysaten RAI3- und RAI3GFP-transfizierter HEK293T Zellen sowie Kontroll-Transfektanten.

Lysate (II.3.4) RAI3- bzw RAI3-GFP transfizierter HEK293T Zellen (II.5.2) sowie zugehörige Kontrollzellen (mock; mockGFP) wurden elektrophoretisch aufgetrennt (II.3.2) und im Western Blot (II.3.3.1) durch Inkubation mit anti-RAI3 mAk 24 2.1 (1:1000) (II.2.3, II.3.8) und Sekundärantikörper GAM^{HRPO} (1:5000) detektiert. Als Kontrolle diente ein HRPO-gekoppelter anti- β -actin Antikörper. Als Substrat diente ein ECL Substrat. Die Substratentwicklung erfolgte für 20 Minuten im LAS-Imager (Fujifilm). Weißlicht und Chemilumineszenz-Signal wurden anschließend in Adobe Photoshop zusammengesetzt.

Auffällig bei dieser Analyse war das scheinbar charakteristische Bandenmuster, das eine starke Homologie zu den Bandenmustern, die bei der Analyse der Zell- bzw. Gewebelysate detektiert wurde, zeigte (vergl. Abbildung III-8 und Abbildung III-9). Durch die deutlich stärkere RAI3-Expression in diesem Modellsystem sind diese Bandenmuster hier deutlicher zu erkennen. Da diese nicht in den Kontrolllysaten detektiert werden, ist eindeutig von einer spezifischen Detektion von RAI3 auszugehen. Neben möglichen proteolytischen Abbauprodukten und unterschiedlichen Glykosylierungsmustern ist auch die bereits beim gereinigten Antigen beobachtete Aggregation als mögliche Erklärung hinzuzuziehen (vergl. Abbildung III-1). Vor allem die höhermolekularen Banden des RAI3-Lysats ließen sich hierdurch erklären. Ein weiterer Hinweis auf eine spezifische Bindung ist die Verschiebung des Bandenmusters in der RAI3-GFP Probe nach oben, die sich durch die Vergrößerung des Proteins durch die GFP-Fusion ergibt.

III.1.11 Immunfluoreszenzfärbung RAI3 transfizierter Zellen

Eine letzte finale Untersuchung zur Spezifität der Antikörperbindung konnte mittels Immunfluoreszenzfärbung (II.3.6) erreicht werden. Auf diese Weise sollte zum Einen die

Lokalisation des RAI3 Rezeptors innerhalb der Zelle bestimmt werden und zum Anderen die spezifische Kolo­kalisierung des RAI3-GFP Signals mit dem durch die anti-RAI3 mAk detektierten Signals untersucht werden. Transient transfizierte HEK293T Zellen wurden auf Objektträgerkammern fixiert und permeabilisiert. Dabei wurde die Zellpopulation so gewählt, dass ein Gemisch aus transfizierten und nicht transfizierten Zellen in einem Ansatz untersucht werden konnte. Durch die direkte Fusion von RAI3 an GFP, lässt sich die Rezeptorexpression innerhalb der Zelle genau lokalisieren. Da nicht die natürlichen regulatorischen Elemente des Proteins im Expressionsvektor vorlagen, konnte nicht sicher von einer Zelloberflächenexpression ausgegangen werden. Bei der Untersuchung mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte eine deutliche Färbung der Zellbegrenzungen einer Teilpopulation detektiert werden. Aber auch starke intrazelluläre Färbung wurde beobachtet (Abbildung III-13). Die Zellen wurden mit dem anti-RAI3 mAk 24 2.3 in einer 1:50 Verdünnung eine Stunde inkubiert und mittels A-546 Sekundärantikörper detektiert. Die Kernfärbung erfolgte mittels Draq5. Es zeigte sich eine starke Kolo­kalisierung des GFP Signals mit dem A-546-Signal (Abbildung III-13, merge). Es erfolgte jedoch keine Färbung der untransfizierten Zellen innerhalb der Gesamtpopulation. Auch die Negativkontrolle ohne Erstantikörper zeigte keinerlei unspezifische Färbung des Sekundärantikörpers, das mit dem RAI3 Signal interferieren könnten (Abbildung III-13, Control). Dieser Versuch zeigt deutlich die hochspezifische Färbung von RAI3 innerhalb der Zelle.

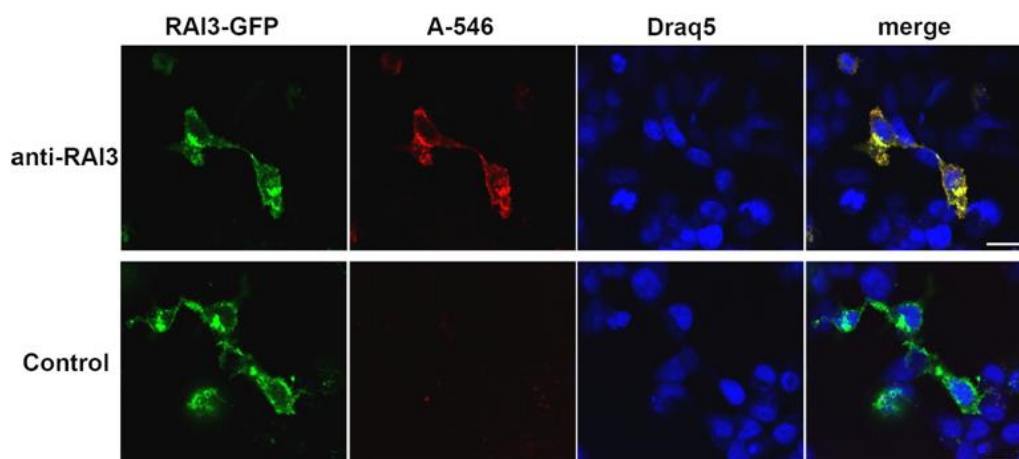


Abbildung III-13 Immunfluoreszenzfärbung RAI3-GFP transfizierter HEK293T Zellen.

Transient transfizierte HEK293T Zellen (II.5.2), die RAI3-GFP exprimieren wurden in einem Gemisch mit untransfizierten Zellen auf Objektträgern fixiert und permeabilisiert. Die Immunfluoreszenzfärbung (II.3.6) erfolgte mit anti-RAI3 mAk 24 2.3 (1:50) (II.2.3, II.3.8) und Anti-Maus AlexaFluor546 (A-546) und ist in der oberen Reihe dargestellt. Die Kolo­kalisierung der Signale ist in der Überlagerung der Signal in gelb dargestellt. Die Negativkontrolle ohne Erstantikörper ist in der zweiten Reihe dargestellt. Die Kernfärbung erfolgte durch Draq5 und ist in blau dargestellt. Der Größenbalken entspricht 20 μm .

Die vielversprechenden Ergebnisse dieser Untersuchung, die die eindeutige Detektion von RAI3 in ganzen Zellen demonstriert, stellen die Basis für die weiteren Untersuchungen in der Immunhistochemie dar.

III.1.12 Etablierung der Immunhistochemie

In den bisherigen Untersuchungen konnte die spezifische Bindung der entwickelten Antikörper an RAI3 demonstriert werden. Allerdings konnte keine Bindung an die Zelloberfläche von RAI3-positiven Tumorzellen und RAI3-transfizierten Zellen gezeigt werden, was einen möglichen therapeutischen Ansatz der Antikörper nahezu unmöglich macht. Aus diesem Grund sollte im Weiteren getestet werden, ob die Antikörper bei der pathologischen Untersuchung von Paraffin-eingebetteten Geweben in der Immunhistochemie funktional sind. Dies würde einen diagnostischen Einsatz der Antikörper ermöglichen.

Die Etablierung der Immunhistochemie (II.3.7) erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie am Uniklinikum Aachen. Dort besteht Zugriff auf eine Reihe von Paraffin-eingebetteten Geweben, die für eine erste Untersuchung der Funktionalität der mAKs eingesetzt werden können. In einer ersten Analyse wurden Schnitte eines Mammakarzinom-Gewebes angefertigt und Testfärbungen mit den einzelnen Antikörpern durchgeführt. Dabei wurden in einem Ansatz eine Mikrowellen Vorbehandlung der Schnitte durchgeführt und mit einem Testansatz ohne Vorbehandlung verglichen. Gleichzeitig wurden zwei Verdünnungsstufen des Antikörpers eingesetzt (1:50 und 1:100) und ebenfalls verglichen. Die Testansätze wurden mit allen vier mAKs durchgeführt und somit das optimale Protokoll sowie der beste Antikörper für diese Färbung identifiziert. Die beste Färbung konnte im Ansatz der Mikrowellen vorbehandelten Schnitte und der 1:50 Verdünnung der Antikörper erzielt werden. Weitere Vergleichsuntersuchungen an Mammakarzinom-Geweben sowie an einer Reihe von Normalgeweben verifizierten die beste Färbung mit mAk 24 2.3. Die nachfolgenden Untersuchungen wurden daher mit diesem Antikörper durchgeführt.

III.1.13 Bestätigung der Spezifität durch Competition

Zur Demonstration der Spezifität der RAI3-Färbung in der Immunhistochemie wurde ein kompetitiver Kontrollversuch durchgeführt (II.3.7). Gewebeschnitte des Mammakarzinoms wurden wie beschrieben mit anti-RAI3 mAk 24 2.3 gefärbt. Parallel dazu wurde ein Komeptitionsansatz durchgeführt bei dem der Antikörper zuvor mit 200-fachem molarem Überschuss an rekombinantem RAI3 inkubiert wurde. Die Färbung in der Immunhistochemie

konnte dadurch deutlich inhibiert werden (Abbildung III-14). Es ist daher auch bei den immunhistochemischen Untersuchungen von einer hochspezifischen Färbung auszugehen.

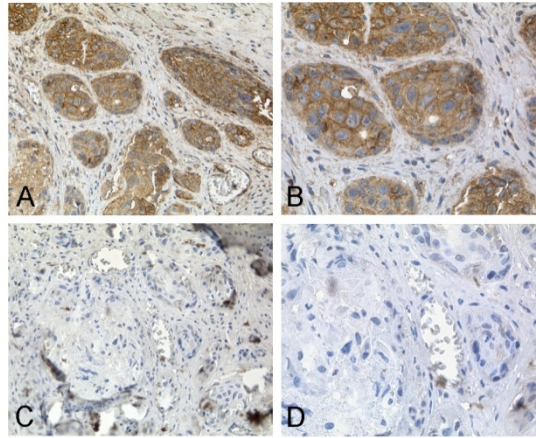


Abbildung III-14 **Kompetition der Färbung von RAI3 in der Immunhistochemie.**

A, B: Deutliche immunhistochemische Färbung (II.3.7) von RAI3 im Mammakarzinom-Gewebe (II.1.10) unter Verwendung des mAk 24 2.3 (1:50) (II.2.3, II.3.8); C, D: Inhibition der Färbung durch Vorinkubation des Antikörpers mit 200-fach molarem Überschuss an rekombinantem RAI3 (II.1.7). Vergrößerungen: A, C: 200x; B, D: 400x.

III.1.14 **Untersuchung eines „Tissue microarray“ vom Mammakarzinom**

Aufgrund der positiven Färbeargebnisse in der Etablierung der Immunhistochemie sollte nun ein sogenannter TMA untersucht werden (II.3.7). Der untersuchte TMA besteht aus einer Zusammenstellung von 147 Mammakarzinom und 44 normalen Brustgeweben Gewebeproben. Diese sind in kleinen Spots mit einem Durchmesser von 2 mm auf Objektträger aufgebracht. Auf diese Weise können eine große Kollektion an Patientengeweben verteilt auf wenige Objektträger zeitgleich auf die Expression von RAI3 untersucht werden. Abbildung III-15 zeigt eine beispielhafte Zusammenstellung der verschiedenen gefärbten Gewebe des TMA.

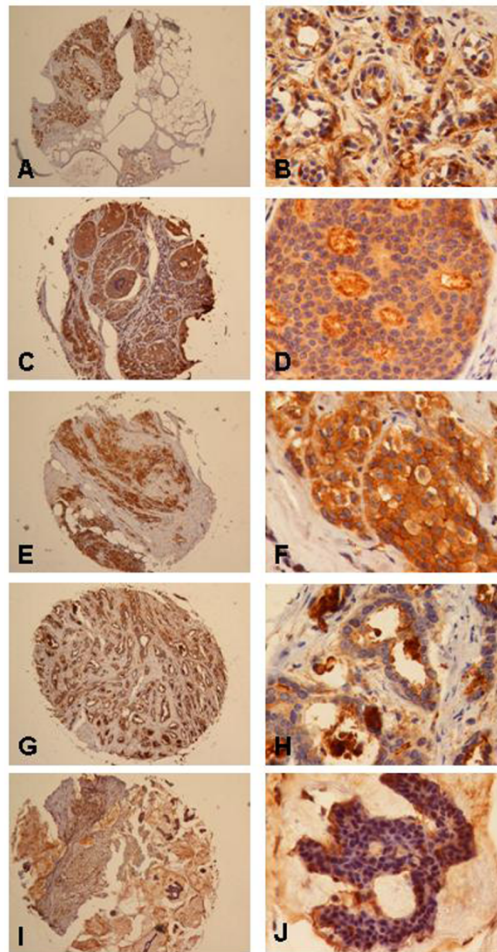


Abbildung III-15 TMA von Mammakarzinom- und Mamma-Normalgeweben.

Immunhistochemische Färbung (II.3.7) von Mammakarzinom und normalen Brustgewebeprobe(n) (II.1.10) für die Expressionsanalyse von RAI3 unter Verwendung des mAk 24 2.3 (1:50) (II.2.3, II.3.8); A, B: Mamma-Normalgewebe, C, D: Invasives Mammakarzinom (Duktal); E, F: Duktales Mammakarzinom *in situ*; G, H: Tubuläres Mammakarzinom; I, J: mukines Mammakarzinom. Vergrößerung: A, C, E, G, I: 40x; B, D, F, H, J: 400x.

Die Färbung wurde anschließend durch eine Pathologin (Dr. Nuran Bektas, Uniklinikum Aachen) untersucht und ausgewertet. Dabei wurde die Färbung von RAI3 nach einem internationalen Bewertungssystem analysiert und sogenannte IRS Punkte vergeben. Der Median der Intensität der Färbung war danach sowohl für die Normalgewebe als auch für die Karzinomproben gleich (IRS=4), jedoch konnten gewisse Unterschiede in der Färbung zwischen den Tumorsubtypen festgestellt werden. Normales Brustepithel (A, B) war häufig schwächer gefärbt als die invasiven Karzinome. Generell war beim invasiven Karzinom (C, D) eine etwas stärkere Expression von RAI3 sowohl im Zytoplasma als auch an der Zellmembran gegenüber den *in situ* Varianten (E, F) und selteneren invasiven Formen des Mammakarzinoms wie des tubulären (G, H) oder mukinen Subtyps (I, J), die auch mit einer besseren Prognose einhergehen. Die Korrelation der IRS Punkte mit den klinischen Patientenparametern, wie Tumorstadium, Lymphknotenstatus, Tumorsubtyp und auch Her2-

Status gab jedoch keine statistisch signifikanten Ergebnisse. Bezüglich des Rezidiv-freien und des Gesamtüberlebens konnte ebenfalls keine statistisch signifikante Korrelation festgestellt werden.

III.2 Untersuchung eines anti-fAChR Immuntoxins

Da eine Weiterentwicklung der RAI3 mAbs hinsichtlich eines therapeutischen Ansatzes nicht möglich war, wurde als zweites Ziel dieser Arbeit die Entwicklung eines Immuntoxins gegen ein neues Zielantigen angestrebt. Als Zielantigen wurde der fAChR ausgewählt. Dieser Rezeptor wird nahezu ausschließlich auf RMS-Zellen exprimiert und stellt damit ein geeignetes Target für eine Antikörper-basierte Therapie dar. Basierend auf einer cDNA Bibliothek einer MG Patientin wurde bereits ein humaner scFv isoliert, der spezifisch gegen die γ -Untereinheit des Rezeptors gerichtet ist. Im Rahmen einer Kooperation mit der Universität Würzburg (Prof. Dr. Stefan Gattenlöhner) konnte auf diesen scFv namens scFv35 als Fusionsprotein mit einer verkürzten Version des ETA' zugegriffen werden. Bestandteil dieser Arbeit waren die Produktion und Reinigung des Fusionsproteins scFv35-ETA' und dessen funktionale Charakterisierung.

III.2.1 Untersuchung der Rhabdomyosarkom-Zelllinien

Für die zellbasierten Untersuchungen des scFv35-ETA' standen eine Reihe von RMS Zelllinien zur Verfügung. Diese sollten mittels RT-PCR (II.4.12) auf die Expression des fAChR im Vorfeld untersucht werden. Gleichzeitig wurden auch eine Reihe von fAChR-negativen Zellen analysiert, die später als Kontrollzelllinien eingesetzt werden können. Dazu wurden Primer eingesetzt, die spezifisch innerhalb Gene für die α -Untereinheit und der γ -Untereinheit binden. Um zeitgleich eine Einteilung des Tumorsubtyps der untersuchten Zelllinien durchführen zu können, wurden außerdem Primer eingesetzt, die die spezifische Amplifikation der PAX3-FKHR Fusion erlaubt, die typischerweise beim alveolären Subtyp des RMS vorliegt. Für die Untersuchung wurde die Gesamt-RNA aus den Zelllinien RD, TE-671, FL-OH-1, Ax-OH-1, RH-30, A-204, U937 und L540 isoliert und mittels oligo dT-Primer in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte die Amplifikation mit den beschriebenen Primern. Als Kontrolle dienten GAPDH Primer.

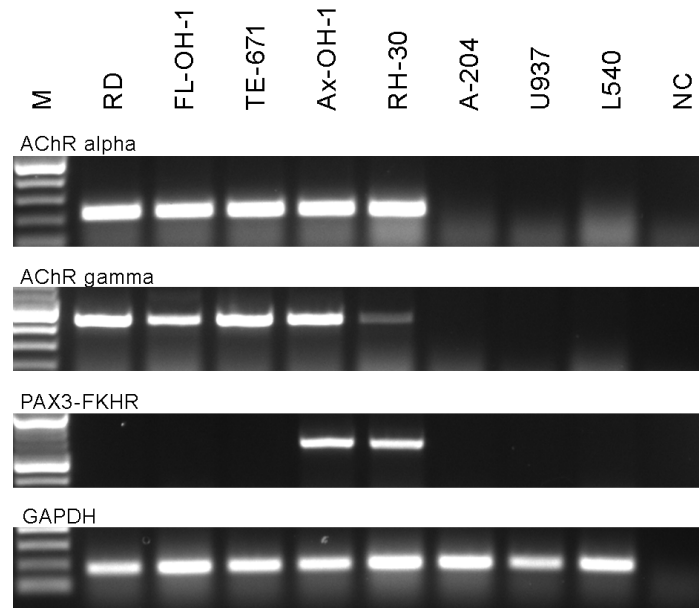


Abbildung III-16 Analyse der AChR-Expression mittels RT-PCR der verschiedenen Rhabdomyosarkom- und Kontrollzelllinien.

Gesamt-RNA (II.4.11) aus den angegebenen Zelllinien wurde mittels oligo dT-Primern und reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und anschließend mit sequenzspezifischen Primern amplifiziert (II.4.12). Die PCR Produkte wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (II.4.2) aufgetrennt und unter UV-Licht visualisiert. AChR alpha: α -Untereinheit des fetalen Acetylcholinrezeptors; AChR gamma: γ -Untereinheit des fetalen Acetylcholinrezeptors. PAX3-FKHR: Genfusion, GAPDH: Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase.

Alle untersuchten RMS Zelllinien zeigten ein spezifisches Amplifikat der α - und γ -Untereinheit (Abbildung III-16). Die Zelllinie RH-30 zeigte trotz vergleichbarer Intensität der GAPDH-Kontrolle eine deutlich schwächere Bande des Amplifikates der γ -Untereinheit. Dies lässt sich auf eine vergleichbar geringere Rezeptorexpression der Zelllinie zurückführen, welches sich durch spätere durchflusszytometrische Messungen bestätigte (Abbildung III-21). Bei den Zelllinien RH-30 und Ax-OH-1 wurde zusätzlich ein deutliches Amplifikat für die PAX3-FKHR Fusion detektiert, was eine Zuordnung dieser Zelllinien zum alveolären Subtyp erlaubt. Die eingesetzten Negativ-Zelllinien zeigten wie erwartet kein fAChR spezifisches Amplifikat und können somit als fAChR-negativ bestätigt werden.

III.2.2 Bakterielle Expression von scFv35-ETA'

Für die bakterielle Expression des Fusionsproteins scFv35-ETA' wurde ein Expressionsvektor eingesetzt, der das Immuntoxin mit N-terminalen pelB-Leader ins Periplasma lokalisiert und damit die Expression in löslicher Form des Proteins ermöglicht. Ein N-terminaler His-Tag erlaubt weiterhin die Reinigung über IMAC (Abbildung III-17).



Abbildung III-17 Schematische Darstellung der Expressionskassette für scFv35-ETA'.

Die Expressionskassette enthält einen N-terminalen *pelB*-Leader zur Einschleusung des Fusionsproteins ins Periplasma. Der N-terminale His-Tag (H_{10}) ermöglicht die Reinigung des Fusionsproteins über IMAC (II.3.9.3).

Hitzeschock-kompetente Bakterien (*E.coli* Rosetta 2 (DE3)) wurden mit dem Plasmid pMTscFv35-ETA' transformiert (II.4.10). Die Auswahl geeigneter Klone für die Expression erfolgte im Schüttelmaßstab unter osmotischem Stress. Für die Herstellung ausreichender Mengen an scFv-ETA' für die funktionalen Analysen wurde eine bakterielle Fermentation im 4L-Maßstab durchgeführt (Abbildung III-18). In Anlehnung an das bereits etablierte Protokoll der Stressexpression und der Erfahrungswerte für die Fermentation wurde diese in Minimalmedium unter reduzierten Stressbedingungen durchgeführt (II.3.9.1). Als Kohlenstoffquelle diente Glukose, welches die Proteinexpression vor der Induktion unterdrückt und somit optimale Wachstumsbedingungen schafft. Die Zugabe der Stressfaktoren erfolgte bei einer OD_{600nm} von 70. Im Anschluss erfolgte die Reduktion der Temperatur auf 28°C und die Zugabe von IPTG zur Induktion der Proteinexpression. Auch nach der Induktion wurde mit Glukose als Kohlenstoffquelle zugefüttert, da dies beim verwendeten *E.coli* Stamm und dem pET-Vektor System auf das der pMT-Vektor beruht, keinen negativen Einfluss auf die Expression hat. Die Induktion wurde für 24 Stunden aufrecht erhalten, die Zellen mittels Zentrifugation geerntet und mittels Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen.

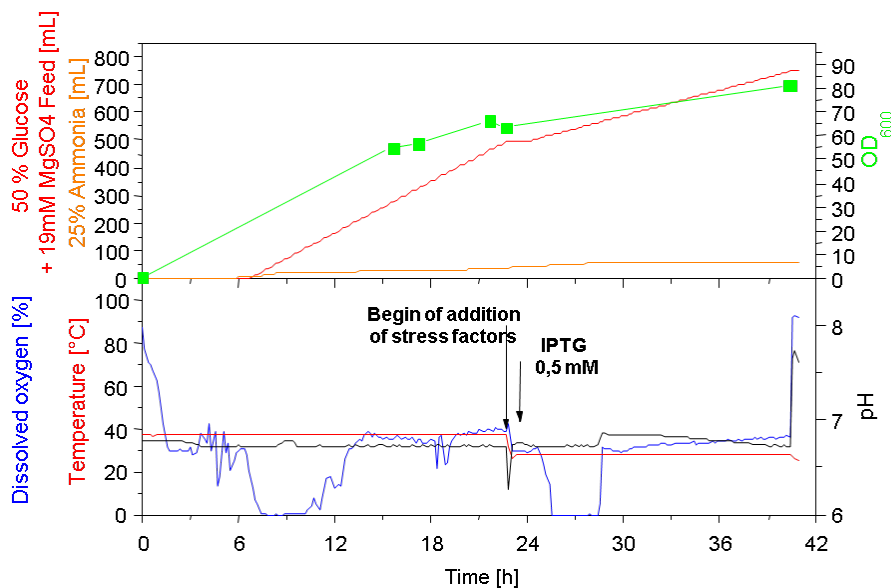


Abbildung III-18 Fermentation scFv35-ETA im 4 L Maßstab unter osmotischem Stress.

Mit pMT-scFv35-ETA' transformierte *E.coli* Rosetta2 (DE3) werden in Minimalmedium im 4-Liter Maßstab fermentiert (II.3.9.1). Nach einer Anzuchtzeit von 24 h und einer OD600 nm von 60 werden die Stressfaktoren sowie der Induktor IPTG (0,5 mM) hinzugegeben und die Induktion für 24 Stunden fortgeführt.

III.2.3 Reinigung des Immuntoxins

Die Reinigung des Immuntoxins aus Bakterien erfolgte in einem mehrstufigen Verfahren. Im direkten Anschluss an die Fermentation wurde das geklärte Zelllysate über eine Streamline Chelating Matrix im Expanded Bed Absorption Verfahren vorgereinigt (Daten nicht gezeigt). Diese Methode eignet sich besonders für die schnelle Verarbeitung großer Volumina. Die gesammelten Eluate aus dieser Reinigung wurden für einen weiteren Reinigungsschritt mittels IMAC (II.3.9.3) eingesetzt. Dieser erfolgte über eine TALON-Superflow Matrix im Äkta FPLC System. Durch die Kombination dieser beiden Reinigungsschritte konnte bereits ein Großteil der kontaminierenden Proteine eliminiert werden (Abbildung III-19 A). Jedoch wurde durch die Analyse der Proben mittels SDS-PAGE (II.3.2) deutlich, dass die Konzentration der Vollängenproteinbande bei ca. 70 kDa im Durchfluss zwar reduziert wurde, jedoch immer noch ein großer Anteil des Proteins darin enthalten war. Eine Analyse der Durchflussprobe in Größenausschlusschromatographie (II.3.9.5) deutete darauf hin, dass es sich hierbei hauptsächlich um Proteinaggregate handelte. Es ist anzunehmen, dass diese eine reduzierte Bindung an die TALON-Matrix aufweisen. Eine andere Erklärung hierfür ist eine mögliche Überladung der Säule. Durch die Waschschrte in der zweiten IMAC Reinigung konnten zwar weitere unerwünschte Proteine abgetrennt werden, jedoch wurde auch bereits ein Teil des Immuntoxins von der Säule eluiert. Als weiteren Reinigungsschritt wurde ein

Ionenaustauscher gewählt (II.3.9.4), der Proteine basierend auf ihrer Ladung trennt. Da der isoelektrische Punkt von scFv35-ETA' bei 6,1 liegt, wurde ein Anionenaustauscher bei pH 8,5 durchgeführt. Bei diesem pH-Wert liegt das Fusionsprotein negativ geladen vor und kann somit an die Anionenaustauschermatrix binden. Durch eine stufenweise Erhöhung der Salzkonzentration wurde das Protein von der Säule eluiert. Abbildung III-19 B zeigt die Proben vor und nach der Reinigung mittels Anionenaustauscher in der SDS-PAGE. Da im Durchfluss kein Vollängenprotein zu detektieren ist kann von einer erfolgreichen Bindung an die Matrix ausgegangen werden. Einige der kontaminierenden Proteine konnten durch den Waschschritt bei 150 nM NaCl von der Säule eluiert werden. Der Reinheitsgrad der Proteinprobe konnte durch diesen Reinigungsschritt auf über 95% gesteigert werden.

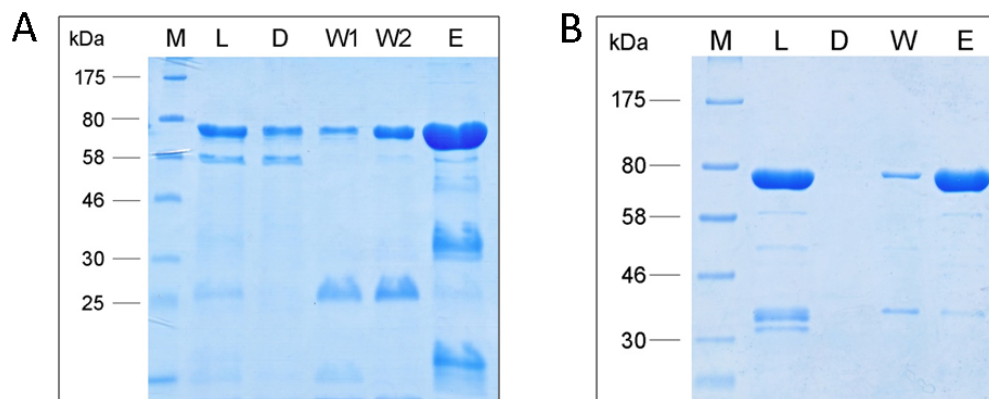


Abbildung III-19 SDS-PAGE zur Demonstration der Reinigung von scFv35-ETA' mittels IMAC und Anionenaustauschchromatographie.

10 μ l der einzelnen Proben wurden mittels SDS-PAGE getrennt und mittels Coomassie-Färbung visualisiert (II.3.2). Das Immuntoxin scFv35-ETA' hat ein Molekulargewicht von ca. 70 kDa. Der Vergleich der Elutionsfraktion nach IMAC (II.3.9.3) (A) und nach Anionenaustauscher (II.3.9.4) (B) zeigt eine deutliche Steigerung des Reinheitsgrades der Proteinprobe. M: Prestained Protein Marker (NEB); L: Probenauftrag (Load); D: Durchfluss; W: Waschfraktion; E: Elution.

Als finaler Schritt der Reinigung erfolgte die Größenausschlusschromatographie (engl.: Size Exclusion Chromatographie SEC), auch Gelpermeationschromatographie genannt (II.3.9.5). Diese wird mittels einer mit porösem Gel gefüllten Säule durchgeführt, die die Trennung von Proteingemischen anhand ihres Molekulargewichtes ermöglicht. Kleine Proteine können in die Poren eindringen, wodurch ihre Elution zurückgehalten wird. Größere Proteine bzw. Proteinaggregate können nicht oder nur teilweise in die Poren eindringen und haben daher eine kürzere Verweildauer auf der Säule. Unerwünschte Proteine unterschiedlichen Molekulargewichtes sowie Proteinaggregate könnten dadurch vom monomeren Vollängen scFv35-ETA' getrennt werden. Gleichzeitig erfolgte die Umpufferung in PBS. Das unter Abbildung III-20 A dargestellte Chromatogramm der Reinigung zeigt deutlich die Trennung zweier Hauptpeaks in der Proteinprobe. Aufgrund von Erfahrungswerten wurde eine Elution des ca 70 kDa großen Fusionsproteins scFv35-ETA' bei einem Retentionsvolumen von ca.

75 bis 80 ml erwartet. Die Elution wurde in kleinen Fraktionen gesammelt, anschließend zu drei Pools zusammengefasst und mittels SDS-PAGE (II.3.2) und Western Blot (II.3.3.2) analysiert (Abbildung III-20 B, C). Es konnte eine saubere Proteinbande mit hoher Konzentration in Pool 3 (entspricht einem Retentionsvolumen von 70-85 ml) detektiert werden. Diese Analyse zeigte jedoch auch deutlich, dass der Hauptanteil der im Pool 2 detektierten Proteine ebenfalls im SDS-PAGE ein Molekulargewicht von ca. 70 kDa aufwiesen und im Western Blot über einen ETA-spezifischen Antikörper detektiert werden konnten. Allerdings wurden diese deutlich früher von der Säule eluiert als die Hauptfraktion des scv35-ETA' in Pool 3. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass es sich dabei um Dimere des scFv35-ETA' handelt. Ein kleiner Anteil des Proteins war ebenfalls in Pool 1 zu detektieren. Hierbei könnte es sich um weitere Aggregate des Immuntoxins handeln. Dieser Reinigungsschritt brachte demnach nicht nur eine weitere Steigerung des Reinheitsgrades, sondern ebenfalls eine Anreicherung des monomeren Proteins.

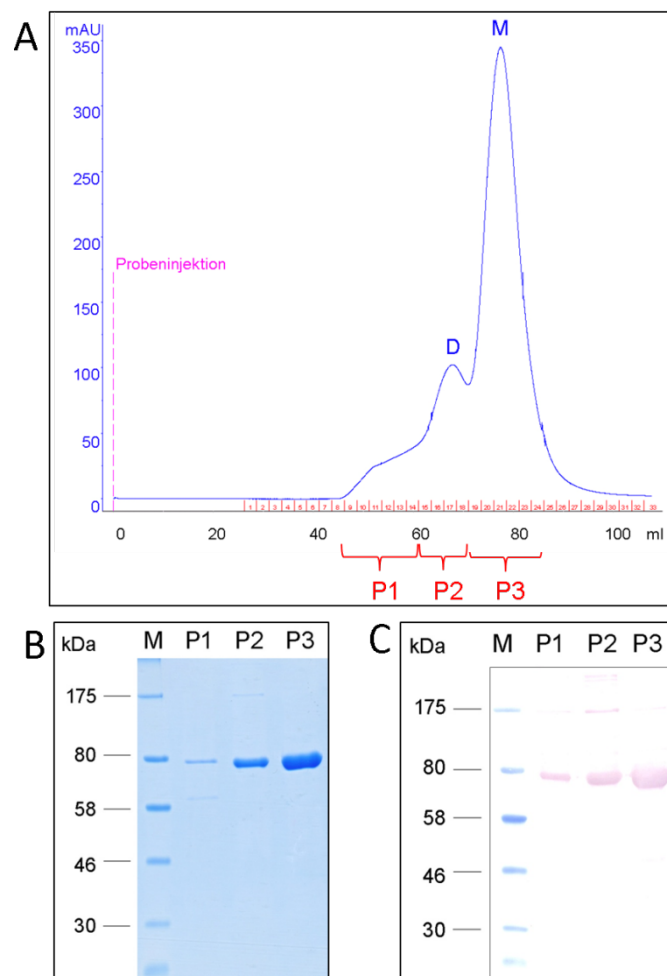


Abbildung III-20 Größenausschlusschromatographie von scFv35-ETA'.

Elutionsfraktion der Anionenaustauschchromatographie (II.3.9.4) des scFv35-ETA' wurde mittels Größenausschlusschromatographie (II.3.9.5) getrennt. **A:** Chromatogramm der Trennung mittels UV-Detektor. Monomeres scFv35-ETA' eluiert bei einem Retentionsvolumen von ca. 78 ml (M). Dimeres scFv35-ETA' eluiert bei ca. 65 ml (D). P1, P2, P3 zeigen die zusammengefassten Fraktionen, die mittels SDS-PAGE (**B**; II.3.2) und Western Blot (**C**; II.3.3.2) untersucht wurden. Die Detektion im Western Blot erfolgte über einen ETA-spezifischen Primärantikörper (TC-1) und GAM^{AP} als Sekundärantikörper. Als Substrat wurde NBT/BCIP eingesetzt.

III.2.4 Spezifische Bindung von scFv35-ETA' an Zielzellen

Die Untersuchung der spezifischen Bindung des gereinigten Immuntoxins scFv35-ETA' an fAChR-positiven RMS Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie (II.3.5). Dazu wurden Zelllinien unterschiedlichen RMS-Subtyps eingesetzt, die zuvor mittels RT-PCR positiv auf ihre fAChR Expression untersucht wurden (III.2.1). Als Kontrollzelllinien wurde die fAChR-negative RMS Zelllinie A-204 und die histiozytische Lymphom-Zelllinie U937 eingesetzt. Für die Messung wurden Zellen mit dem Immuntoxin inkubiert und die Bindung über den ETA-spezifischen TC-1 Antikörper und GAM^{PE} als fluoreszierenden Nachweisantikörper detektiert. Die Analyse zeigte deutlich die Bindung des Immuntoxins an die fAChR-positive Zelllinien und keine Reaktionen gegenüber den Kontrollzelllinien (Abbildung III-21). Ein Vergleich mit

den unter Kapitel III.2.1 beschriebenen Analysen der fAChR-Expression zeigt eine Korrelation der Expressionslevel mit der Intensität der Fluoreszenz bzw. der Größe der Shifts in der Durchflusszytometrie. So wurden auch in dieser Messung deutlich geringere Shifts bei der Zelllinie RH-30 gemessen, was ebenfalls ein Hinweis auf ein niedrigeres Expressionslevel des Rezeptors gibt. Zur Kontrolle einer möglichen unspezifischen Bindung von ETA' an die verschiedenen Zelllinien wurde eine Kontrollmessung unter gleichen Bedingungen mit einem ähnlichen Fusionsprotein H22-ETA' durchgeführt. Dieses zeigte keinerlei Bindung an die getesteten Zelllinien, so dass von einer spezifischen Bindung an die RMS-Zellen auszugehen ist.

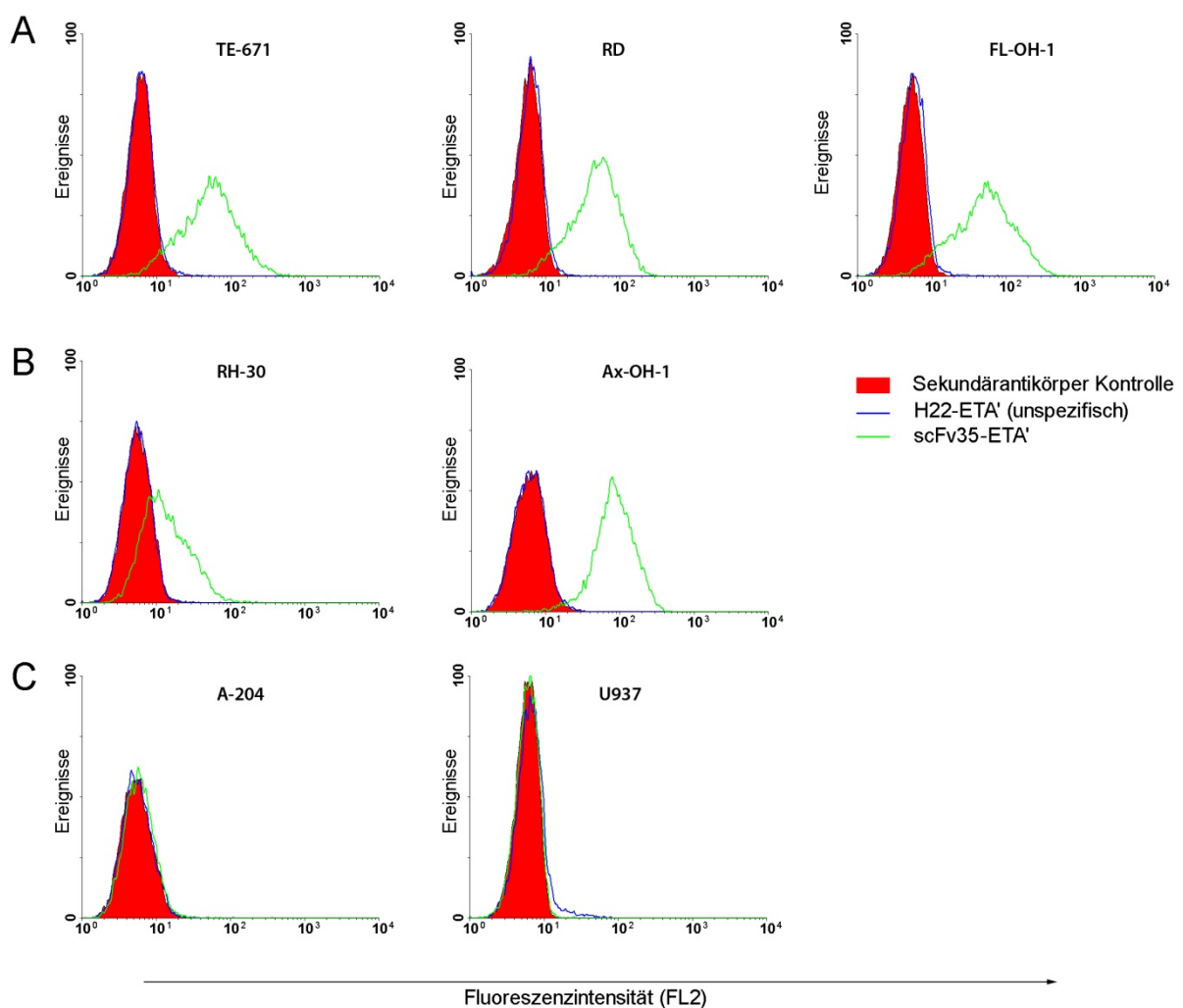


Abbildung III-21 Bindungsanalyse von scFv35-ETA' auf RMS und Kontrollzelllinien.

Die Messung der Bindung von scFv35-ETA' an RMS Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie (II.3.5). fAChR-positive RMS Zelllinien des embryonalen (A) und alveolären (B) Subtyps sowie fAChR-negative Kontroll-Zelllinien (C) wurden analysiert. Zur Detektion der Bindung wurde der ETA-spezifische TC-1 Antikörper und GAM^{PE} eingesetzt. Dabei konnte die spezifische Bindung von scFv35-ETA' an RMS Zelllinien demonstriert werden (grüne Linie). Das Kontrollprotein H22-ETA' (blaue Linie) zeigte keine Bindung gegenüber der Sekundärantikörperkontrolle (rot ausgefüllt).

III.2.5 Affinitätsbestimmung

Für die Bestimmung der funktionalen Affinität des Immunotoxins scFv35-ETA' wurde ein durchflusszytometrischer Ansatz durchgeführt (II.5.6). Eine Verdünnungsreihe des Immuntoxins wurde auf den Zelllinien RD, FL-OH-1 und RH-30 inkubiert und die Fluoreszenzsignale wie zuvor detektiert. Zur Kalkulation wurde der Median der Fluoreszenzintensität eingesetzt, der über die Software WinMDI 2.8 ermittelt wurde. Nach Abzug des Nullwerts (Zellen ohne Immunotoxin) wurden die ermittelten Fluoreszenzsignale gegen die Konzentration aufgetragen und es konnten mittels nicht linearer Regression in GraphPad Prism die funktionalen K_D -Werte bestimmt werden (Abbildung III-22). Dieser lag für alle Zelllinien in einem vergleichbaren Rahmen von 3,6 bis 4,8 nM.

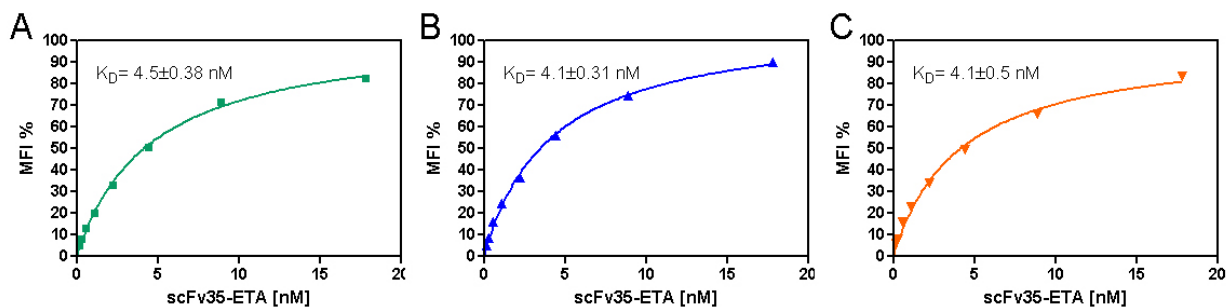


Abbildung III-22 Bestimmung der funktionalen Affinität von scFv35-ETA' auf drei verschiedenen RMS-Zelllinien.

Die funktionale Affinität (II.5.6) wurde durch Inkubation von scFv35-ETA' in steigenden Konzentrationen auf den RMS Zelllinien RD (A), FL-OH-1 (B) und RH-30 (C) und anschließender Messung und Auswertung über den Median der gemessenen Fluoreszenzsignale (MFI) mittels GraphPad Prism bestimmt. Dabei wurde das Signal der höchsten Intensität in der Sättigung als 100% und das Signal der Sekundärantikörperkontrolle als 0% angesetzt. Die Detektion erfolgte mittels TC-1 und GAM^{PE} mittels Durchflusszytometrie (II.3.5) im FACS Calibur.

III.2.6 Internalisierung

Eine der Grundvoraussetzungen für ein funktionales Immunotoxin, ist neben der spezifischen Rezeptorbindung vor allem die effektive Internalisierung des Liganden und damit der toxischen Effektor-domäne. Um diese Eigenschaft zu untersuchen wurden Zellen der Zelllinien RD, FL-OH-1 und RH-30 auf Eis mit dem Immunotoxin inkubiert, gewaschen und im Anschluss für verschiedene Zeiträume in R-10 Medium bei 37°C inkubiert. Es folgte eine indirekte Messung der auf der Oberfläche verbleibenden Fusionsproteine mittels Durchflusszytometrie (II.5.5). Als Referenz galt die Probe bei Inkubation auf Eis. Die Reduktion des Fluoreszenzsignales gibt dabei Hinweise auf die Internalisierung des Proteins. Bereits nach 15 min konnte eine Reduktion des Signales um 20 bis 30% gemessen werden, was auf den Beginn der Internalisierung hindeutet (Abbildung III-23). Auf allen Zelllinien konnte nach einer Inkubation von zwei Stunden weniger als 20% des

Ausgangssignales gemessen werden. Nach weiteren zwei Stunden konnte dies nur noch geringfügig gesteigert werden. Insgesamt verlief der Internalisierungsprozess innerhalb der ersten Stunde bei der Zelllinie RD geringfügig schneller als bei den Zelllinien FL-OH-1 und RH-30, die ein nahezu identisches Internalisierungsverhalten zeigten.

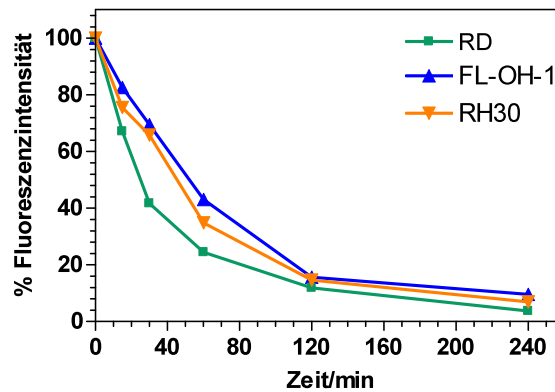


Abbildung III-23 Zeitlicher Verlauf der Internalisierung von scFv35-ETA' für drei verschiedene RMS Zelllinien.

Zur Bestimmung der Internalisierung (II.5.5) wurden die RMS-Zellen (RD, FL-OH-1, RH30) nach Inkubation mit scFv35-ETA' auf Eis mit gebundenem Immuntoxin für verschiedene Zeitintervalle (15, 30, 60, 120, 240 min) bei 37°C in R-10 Medium inkubiert. Auf der Oberfläche verbleibendes scFv35-ETA' wurde mittels TC-1 Antikörper und GAM^{PE} im FACS Calibur detektiert (II.3.5). Für die graphische Auswertung mittels GraphPad Prism wurden die Mediane der Fluoreszenzsignale der einzelnen Messwerte herangezogen und mit den Medianen der 4°C Kontrolle (100% Bindung) und der Sekundärantikörperkontrolle (0% Bindung) in Relation gesetzt.

III.2.7 Charakterisierung der zytotoxischen Wirkung von scFv35-ETA'

Nach der erfolgreichen Reinigung und Untersuchung des Bindungs- und Internalisierungsverhaltens des Immuntoxins scFv35-ETA' wurde die entscheidende zytotoxische Wirkung des Fusionsproteins an RMS-Zellen analysiert. Um sicherzustellen, dass die Zytotoxizität auf die spezifische Bindung und Internalisierung des Immuntoxins scFv35-ETA' und nicht auf unspezifische Wirkung des Toxins ETA' alleine zurückzuführen ist, wurde das Immuntoxin H22-ETA', das im Rahmen anderer Projekte zu Verfügung stand, für die Untersuchung hinzugezogen. Unter III.2.4 konnte bereits gezeigt werden, dass dieses Immuntoxin nicht an RMS-Zellen bindet. Abbildung III-24 zeigt SDS-PAGE (II.3.2) und Western Blot-Analyse (II.3.3.2) der beiden für den folgenden Versuch eingesetzten Proben. Beide Proben wurden in einem hohen Reinheitsgrad eingesetzt.

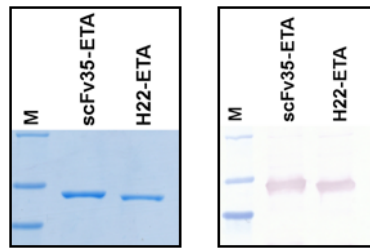


Abbildung III-24 SDS-PAGE und Western Blot-Analyse der eingesetzten Proben.

250 ng der Proteine scFv35-ETA' und H22-ETA' wurden mittels SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie Brilliant Blau visualisiert (II.3.2). Die Detektion im Western Blot (II.3.3.2) erfolgte mittels TC-1 Antikörper und GAM^{AP} als Sekundärantikörper. Als Substrat wurde NBT/BCIP eingesetzt.

Die zytotoxische Wirkung von scFv35-ETA' wurde mittels XTT-Proliferationstest (II.5.3) analysiert. Dieser Test basiert auf der Fähigkeit lebender Zellen das XTT-Tetrazoliumsalz in den orangen Farbstoff Formazan zu reduzieren. Dieser Farbumschlag kann photometrisch bei 450 nm unter Abzug einer Referenzwellenlänge von 630 nm im 96-Well Format im ELISA-Reader gemessen werden. Dazu wurden die embryonalen RMS Zelllinien RD, TE-671 und FL-OH-1 sowie die alveolären RMS Zelllinien Ax-OH-1 und RH-30 als auch die fAChR-negativen Kontrollzelllinien U937 und A-204 in 96-Well Zellkulturplatten ausgesät und mit seriellen Verdünnungen des Immuntoxins scFv35-ETA' und dem Kontrollprotein H22-ETA' für 72 Stunden inkubiert. Auf allen getesteten fAChR-positiven Zelllinien konnte eine dosisabhängige Zytotoxizität des Immuntoxins gemessen werden wohingegen fAChR-negative Zellen nahezu unbeeinflusst blieben (Abbildung III-25). Die IC₅₀-Werte variierten dabei stark unter den verschiedenen getesteten Zelllinien und lagen zwischen 0,13 nM (FL-OH-1) und 113 nM (RH-30). Bei allen Zelllinien lag die IC₅₀ für das unspezifische Immuntoxin H22-ETA' deutlich höher (3 bis 100-fach) als für das fAChR-spezifische Immuntoxin scFv35-ETA', was die Spezifität der zytotoxischen Wirkung bestätigt. Die jeweiligen IC₅₀-Werte sind in Tabelle III-3 zusammengefasst.

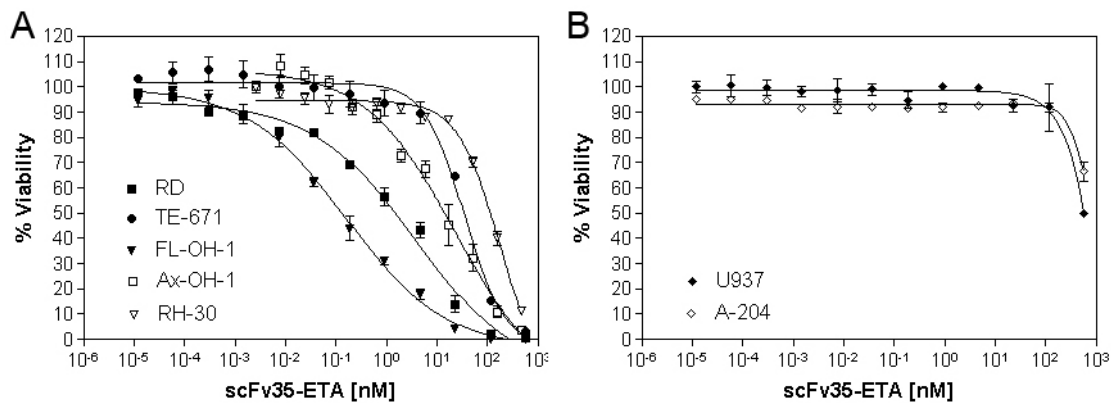


Abbildung III-25 XTT-Zytotoxizitätstest von scFv35-ETA' auf fAChR-positiven RMS-Zellen und fAChR-negativen Kontrollzellen.

RMS-Zellen und Kontrollzellen wurden mit Verdünnungsreihen des anti-fAChR Immunttoxins scFv35-ETA' für 72 Stunden inkubiert. Die Messung mittels XTT-Reagenz (II.5.3) zeigt eine deutliche dosisabhängige Zytotoxizität auf allen positiven Zelllinien (A) wohingegen deutlich geringere bis keine Toxizität auf den negativen Zelllinien (B) zu detektieren ist. Die Messung wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Viabilität ist berechnet als prozentualer Anteil des Farbumschlags gegenüber unbehandelten Zellen.

Tabelle III-3 Übersicht über die mittleren IC₅₀ Werte von scFv35-ETA' im Vergleich zu H22-ETA'.

| | IC ₅₀ [nM] | | | | | | |
|-------------|-----------------------|-----|---------|---------|-------|------|-------|
| | TE-671 | RD | FL-OH-1 | Ax-OH-1 | RH-30 | U937 | A-204 |
| scFv35-ETA' | 34 | 1,5 | 0,13 | 14 | 113 | >500 | >500 |
| H22-ETA' | 113 | 22 | 12 | 90 | >500 | >500 | >500 |

Zur weiteren Demonstration der spezifischen Toxizität des Immunttoxins wurde ein kompetitiver XTT-Ansatz (II.5.3) durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen mit einer konstanten Konzentration an scFv35-ETA' und verschiedenen Konzentrationen eines Kontrollproteins bestehend aus scFv35 in Fusion mit einem nicht-toxischen Protein-Tag (SNAP-Tag) inkubiert. Der Versuch zeigte deutlich, dass sich die toxische Wirkung von scFv35-ETA' durch Zugabe von 1-100-fachem molaren Überschuss des Kontrollproteins kompetitieren ließ ohne, dass dieses dabei selbst eine toxische Wirkung zu zeigen (Abbildung III-26).

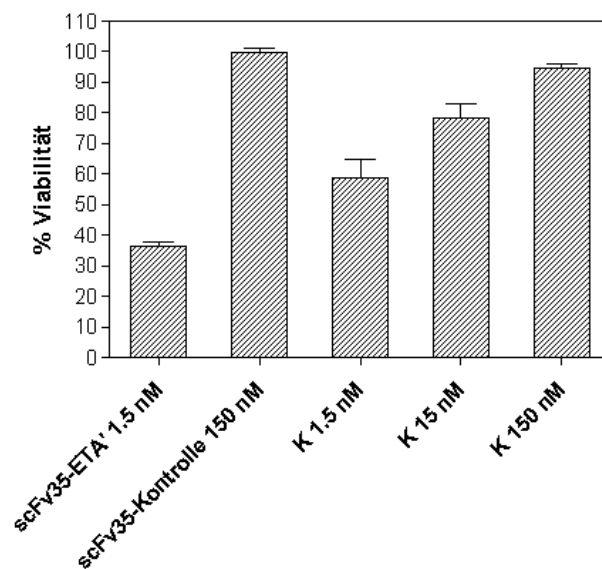


Abbildung III-26 Kompetitiver XTT-Zytotoxizitätstest auf RD Zellen.

Die Toxizität des Immuntoxins scFv35-ETA' (1,5 nM) auf RD Zellen konnte im kompetitiven XTT-Zytotoxizitätstest (II.5.3) durch Inkubation mit 1-100-fachem molarem Überschuss (K 1,5-150 nM) des Kontrollproteins ohne toxischer Domäne (SNAP-scFv35) inhibiert werden. Das Kontrollprotein zeigte dabei auch in hoher Konzentration (150 nM) keinerlei Einfluss auf die Zellviabilität.

Weiterhin wurde untersucht, ob das Immuntoxin scFv35-ETA' Apoptose in den Zielzellen induziert. Dazu wurde die Zielzelllinie RD und die Kontrollzelllinie A-204 mit 1 µg/ml scFv35-ETA' für 12, 24 und 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Apoptoseinduktion wurde über die spezifische Färbung von PS über Annexin V in Kombination mit einer PI-Färbung und anschließender durchflusszytometrischen Messung durchgeführt (II.5.4). Die Messung ergab eine Steigerung der Annexin V-Färbung innerhalb der gemessenen Zeitpunkte. Nach 48 Stunden zeigten 51,7% der RD Zellen eine apoptotische Färbung im Vergleich zur PBS-Kontrolle (9,3%), wobei 13,3% der frühen Apoptose (nur Annexin V-positiv) und 38,4% der späten Apoptose (Annexin V und PI-Färbung) zugeordnet werden können (Abbildung III-27 A). Im Vergleich dazu blieben die A-204 Zellen jeweils unberührt (Abbildung III-27 B).

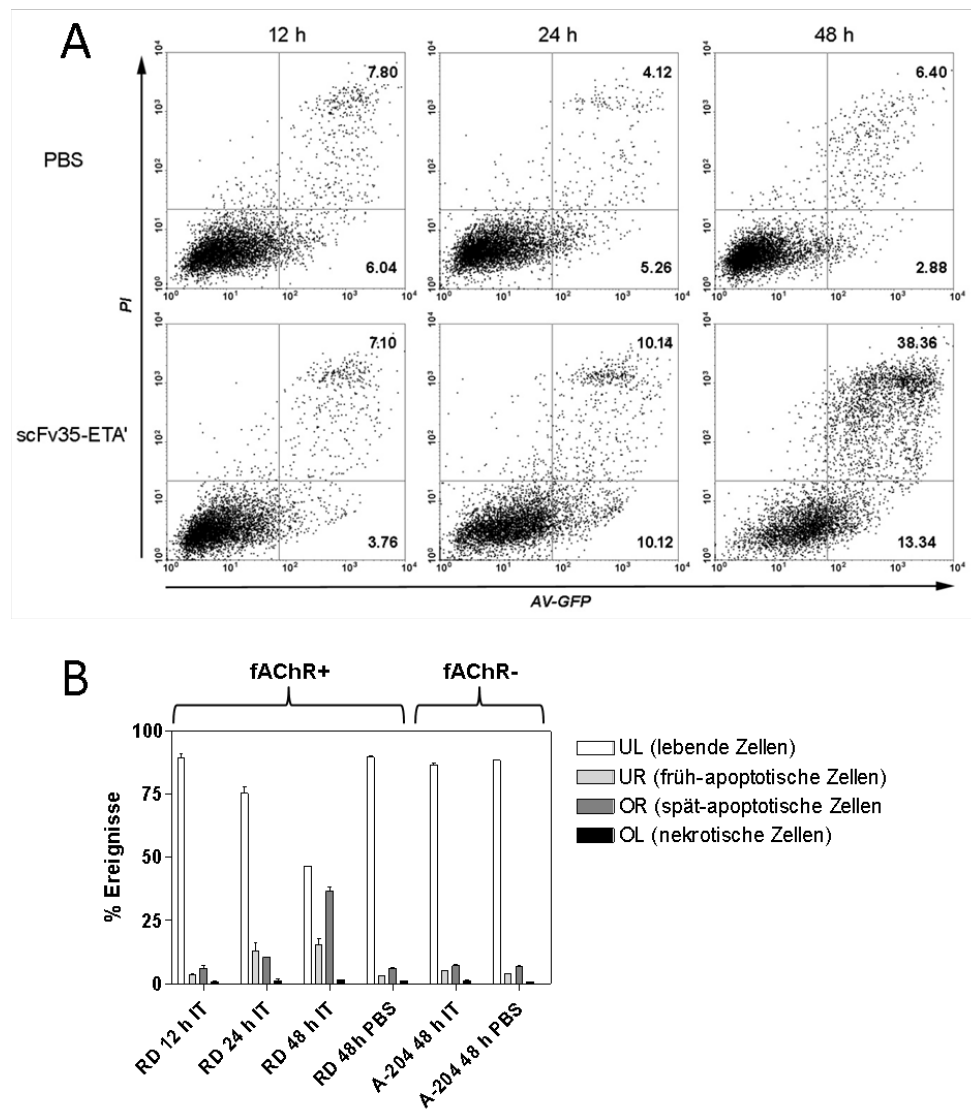


Abbildung III-27 Demonstration der Apoptoseinduktion durch scFv35-ETA' auf RD und A-204 Zellen.

Zellen wurden mit 1 $\mu\text{g/ml}$ scFv35-ETA' oder mit PBS als Kontrolle für 12, 24 und 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Messung der Apoptoseinduktion erfolgte über die durchflusszytometrische Analyse der Annexin V (AV-GFP)/PI-Doppelfärbung (II.5.4). **A:** Darstellung der Dotplots und Quadrantenauswertung der RD Zellen. Zahlen entsprechen dem prozentualen Anteil der gemessenen Ereignisse im Quadranten. **B:** Graphische Darstellung der prozentualen Anteile der Zellen in den Quadranten für RD und A-204 Zellen. UL: unten/links, UR: unten/rechts, OR: oben/rechts, OL: oben/links.

Die durchgeführten Analysen demonstrieren die spezifische Toxizität und Apoptoseinduktion von scFv35-ETA' auf fAChR-positiven RMS Zellen.

III.2.8 Serumstabilitätstest

In den vorangehenden Analysen konnte bereits die spezifische Funktionalität des Immuntoxins scFv35-ETA' verdeutlicht werden. Im Folgenden sollte die Stabilität des Immuntoxins im Serum untersucht werden (II.3.12), da dies eine wichtige Voraussetzung für

die systemische, intravenöse Applikation des Wirkstoffs ist. Dazu wurde das Immuntoxin für verschiedene Zeiträume (0 bis 48 Stunden) in humanem Serum bei 37°C inkubiert und anschließend mittels Western Blot-Analyse (II.3.3.2) und Durchflusszytometrie (II.3.5) untersucht (Abbildung III-28). Die quantitative Auswertung ist in Tabelle III-4 zusammengefasst. Die Proteinanalyse im Western Blot zeigte nur geringfügige Reduktion der Proteinkonzentration des detektierten Volllängenproteins nach 24 (71%). Auch nach 48 Stunden konnten noch 58% der Ausgangsmenge detektiert werden. Die PBS Inkubation zeigte hingegen keinen Einfluss auf die Proteinkonzentration (94% nach 48 Stunden). Die Funktionsanalyse in der Durchflusszytometrie wurde mittel TC-1 Antikörper und GAM^{PE} als Sekundärantikörper durchgeführt. Dabei wurde die prozentuale Fluoreszenzintensität gegenüber der Null-Stunden Inkubation (100% Bindung) und der Serumkontrolle (0% Bindung) als prozentuale Bindungsaktivität angenommen. Hierbei konnte bei den seruminkubierten Proben eine deutliche Abnahme der Bindungsaktivität nach 24 h (17% Bindung) detektiert werden, welche nach 48 h auf etwa 4 % weiter sank. Allerdings wurde auch eine Reduktion der Bindungsaktivität der PBS-inkubierten Proben gemessen. Die verbleibende Aktivität lag jedoch jeweils höher als bei der Seruminkubation (49 % bei 24 Stunden und 13% bei 48 Stunden). Es scheint demnach auch eine gewisse Temperatur-abhängige Instabilität vorzuliegen.

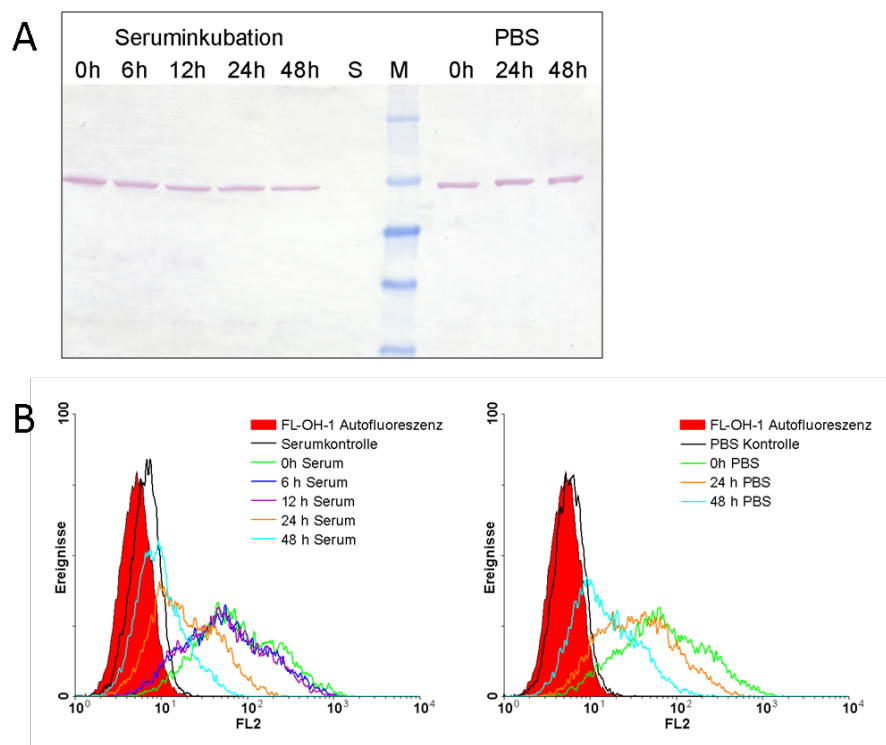


Abbildung III-28 Untersuchung der Serumstabilität von scFv35-ETA' mittels Western Blot und Durchflusszytometrie.

200 µg/ml scFv35-ETA' wurden in 50%(v/v) humanem Serum für 0, 6, 12, 24 und 48 Stunden bei 37°C inkubiert (II.3.12). Als Kontrolle wurden Inkubationen in PBS für 0, 24 und 48 h durchgeführt. Die Proben wurden auf ihre Proteinkonzentration im Western Blot (II.3.3.2) durch Detektion mit einem anti-His Antikörper und GAM^{AP} als Sekundärantikörper (A) und auf Bindungsfunktionalität mittels Durchflusszytometrie (II.3.5)(B) analysiert.

Tabelle III-4 Prozentuale Auswertung Serumstabilitätstest (II.3.12) basierend auf Abbildung III-28

| | Serum | | | | | PBS | | |
|------------------------------|-------|----|----|----|----|-----|-----|----|
| Inkubationszeit (h) | 0 | 6 | 12 | 24 | 48 | 0 | 24 | 48 |
| Protein (%) | 100 | 84 | 73 | 71 | 58 | 100 | 100 | 94 |
| Bindungsaktivität (%) | 100 | 75 | 69 | 17 | 4 | 100 | 49 | 13 |

III.2.9 *In vivo* Mausversuch

Die Aktivität des Immuntoxins wurde neben den gezeigten *in vitro* Untersuchungen auch in einem *in vivo* Mausversuch untersucht. Dieser Versuch wurde unter der Leitung unseres Kooperationspartners und Projektinitiators Prof. Dr. Stefan Gattenlöhner im Institut für Pathologie an der Universität Würzburg durchgeführt. Hierbei wurden SCID Mäusen subkutan RD Tumore injiziert. Ab dem zweiten Tag nach Tumordinjektion wurden die Mäuse (n=6) bis Tag 10 zweimal täglich i.p. mit 10 µg scFv35-ETA' behandelt. In der Kontrollgruppe (n=4) wurde den Mäusen lediglich PBS verabreicht. Die Tumorgöße wurde alle 2-3 Tage

bestimmt. In diesem Versuch konnte eine deutliche Inhibition des Tumorwachstums bei den behandelten Mäusen gegenüber der Kontrollgruppe gezeigt werden, was die funktionale *in vivo* Aktivität des Proteins bestätigt. Nach Absetzen der Behandlung kam es erneut zum Wachstum des Tumors [98].

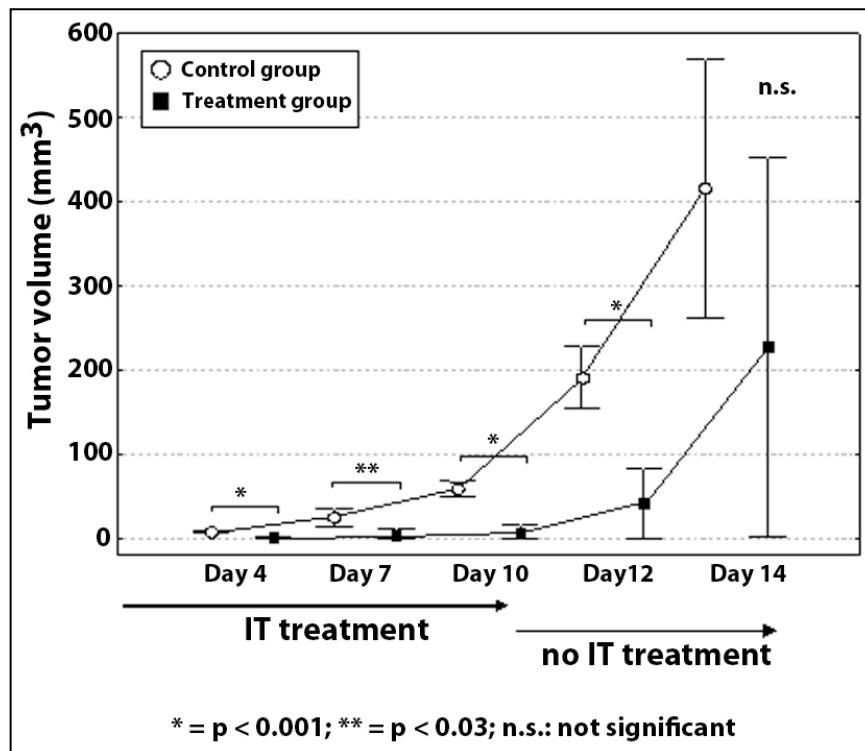


Abbildung III-29 Behandlung von subkutanen Tumoren der RD-Zelllinie in SCID Mäusen mit scFv35-ETA'.

Insgesamt zehn SCID Mäusen wurden subkutan 1×10^5 RD Zellen transplantiert. Der Behandlungsgruppe (n=6) wurde ab Tag zwei zweimal täglich $10 \mu\text{g}$ scFv35-ETA' i.p. appliziert. Die Behandlung erfolgte bis Tag 10 einschließlich. Der Kontrollgruppe (n=4) wurde die Pufferlösung PBS in gleicher Weise verabreicht. (Abbildung aus Gattenlöhner, Jörißen *et al.*, 2010 [98])

IV DISKUSSION

Bisherige Ansätze zur Krebstherapie basieren hauptsächlich auf der massiven Zerstörung maligner Zellen mittels antineoplastischer Chemotherapie, die meist aus der Kombination verschiedener Zytostatika besteht. Diese wenig spezifische Form der Krebstherapie geht in der Regel mit starken Nebenwirkungen einher. Neben den häufigen, jedoch reversiblen Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Schleimhautentzündungen und Haarausfall können zum Beispiel auch schwere, irreversible Schädigungen der Herzmuskulatur durch Anthracycline wie Doxorubicin auftreten und vor allem bei geschwächten Patienten den Therapieerfolg limitieren bzw. schwerwiegende Folgeerkrankungen, wie Herzrhythmusstörungen auslösen [99]. Auch die Entwicklung von Resistenzen gegenüber erhältlichen Wirkstoffen stellt ein großes Problem dar. Obwohl durch neue Wirkstoffe, wie Kinaseinhibitoren und erste therapeutische Antikörper und neue Kombinationen bereits eine deutliche Verbesserung der Effektivität und Spezifität der Therapie erzielt werden konnte, bleibt die Suche nach neuen Zielproteinen und neuen spezifischen Therapiemöglichkeiten eine große Herausforderung der Pharmaindustrie [100]. Dabei spielen vor allem Antikörper und Antikörperfusionsproteine eine immer größere Rolle, sowohl für die Therapie als auch für die Krebsdiagnose. Mit Hilfe dieser hochspezifischen Moleküle lassen sich tumorassoziierte Antigene zielgerichtet adressieren um somit Wirkstoffe an ihren Einsatzort zu transportieren oder eine Rezeptorinhibition herbeizuführen. Durch die Identifizierung prognostisch relevanter Marker in pathologischen Untersuchungen mittels monoklonaler Antikörper kann eine Diagnose sowie die Prognose des einzelnen Krebspatienten besser beurteilt und passende Behandlungsstrategien ausgewählt werden. Im Rahmen dieser Arbeit werden mAbs gegen ein solches potentiell tumorassoziiertes Antigen, RAI3 generiert und charakterisiert. Die Produktion und funktionale Analyse eines Immuntoxins gegen ein zweites tumorspezifisches Antigen, den fAChR wurde im zweiten Teil dieser Arbeit behandelt. Die Ergebnisse, Hintergründe und Zukunftsperspektiven der vorliegenden Arbeit werden in diesem Kapitel diskutiert

IV.1 RAI3 als potentieller Tumormarker

IV.1.1 Monoklonale anti-RAI3 Antikörper

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Generierung und Charakterisierung von mAbs gegen den GPCR RAI3. Aufgrund ihrer besonderen Struktur wird die Expression und Reinigung rekombinanter GPCRs als besonders schwierig und anspruchsvoll angesehen, was eine limitierte Verfügbarkeit reiner rekombinanter Proteine zu Folge hat [101-103]. Die

Generierung funktionaler Antikörper mittels Hybridomatechnologie wird dadurch erheblich erschwert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch die Kooperation mit der Firma M-Fold Biotech eine ausreichende Verfügbarkeit des rekombinanten GPCRs RAI3 realisiert werden. Die von M-Fold patentierte Technologie ermöglicht die Expression und native Faltung der rekombinanten Proteine durch Liposomenintegration [104]. Die Immunisierung von BALB/c Mäusen mit dem so hergestellten RAI3 führte zu einer schnellen Immunantwort mit spezifischen Antikörpertitern von bis zu 1: 100.000 nach etwa sechs Wochen (III.1.1). Die klassische Hybridomatechnik hat den Vorteil einer einfachen Durchführung bei verfügbarem Protein. Sie ist eine wesentlich ausgereifere Methode und damit erfolgsversprechender als Methoden der genetischen Immunisierung, wie sie zum Teil zur Gewinnung von GPCRs aufgrund des Mangels an Verfügbarkeit des Proteins eingesetzt wird [105]. Die Firma Multispan generiert mAbs gegen GPCRs durch Immunisierung mit ganzen Zellen, die jedoch die stabile Transfektion und anschließende Bestrahlung der Zellen voraussetzt und damit ebenfalls mit sehr hohem Aufwand verbunden ist. Einfachere Methoden zur Generierung von mAb gegen GPCRs beruht auf dem Einsatz von Peptiden. Diese Methode hat jedoch den Nachteil, dass die daraus resultierenden Antikörper in der Regel lineare Epitope erkennen und somit nicht in der Lage sind den gefalteten Rezeptor zu detektieren [106]. Durch die Kombination der M-Fold Technologie mit der klassischen Hybridomatechnik, ist es uns gelungen fünf monoklonale anti-RAI3 Antikörper mit hoher Spezifität und Affinität gegen den funktionalen Rezeptor zu generieren (III.1.2). Die spezifische Bindung der Antikörper wurde durch verschiedene immunologische Methoden, wie ELISA, Western Blot, Immunofluoreszenz und Immunhistochemie verifiziert. Eine spezifische Bindung an der Zelloberfläche von RAI3-positiven Zellen konnte mittels Durchflusszytometrie jedoch nicht nachgewiesen werden (Abbildung III-7). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist eine Spezifität der Antikörper für intrazelluläre Epitope. Der C-Terminus, sowie drei Loops des Rezeptors liegen intrazellulär vor und sind daher in einem durchflusszytometrischen Ansatz mit intakten Zellen nicht erreichbar. In einem Durchflusszytometrie-Versuch mit permeabilisierten Zellen (Daten nicht gezeigt) zeichnete sich ein starkes Signal bei permeabilisierten Zellen ab. Allerdings musste hier ein starker Zellverlust der permeabilisierten Zellen durch die Waschschriffe sowie starke unspezifische Bindung eines Kontrollantikörpers hingenommen werden, was keine aussagekräftige Auswertung der Daten zuließ. In der Immunofluoreszenz wurde daraufhin ein ähnlicher Ansatz durchgeführt, bei dem man die spezifische Färbung von RAI3 in permeabilisierten Zellen nachweisen konnte (Abbildung III-13). Diese Ergebnisse unterstreichen diese Vermutung. Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden neben Zelllinien mit endogener RAI3 Expression auch RAI3-transfizierte Zellen eingesetzt. Bei der Konstruktion der dafür eingesetzten Plasmide pMS RIII und pMS RAIGFP MH (Abbildung III-10) wurde auf die

häufig für membranständige und sekretorische Proteine eingesetzte Ig-kappa-Leader Sequenz verzichtet. Über 90% der GPCRs haben keine N-terminale spaltbare Signalsequenz und verfügen vielmehr über alternative Mechanismen, die die Translokation des N-Terminus durch die Membran in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums initiieren [107]. Statistischen Untersuchungen zur Folge verfügen diejenigen GPCRs ohne natürliche Signalsequenz über eine kurze N-terminale Domäne von etwa 40 Aminosäuren [108]. Da RAI3 über einen solchen, kurzen N-Terminus (33 Aminosäuren) verfügt und die natürliche Assemblierung des Proteins erwünscht war, wurde auf eine zusätzlich eingefügte Signalsequenz verzichtet. Die durchgeführte Immunofluoreszenzanalyse zeigte eine deutliche Expression des RAI3GFP Fusionsproteins sowohl im Zellinneren als auch an der Zellmembran. Eine vergleichbare subzelluläre Lokalisation von RAI3 wurde ebenfalls von Cheng *et al.* nach Transfektion von HeLa-Zellen beobachtet [42]. Es ist jedoch durchaus denkbar, dass sich die Expression an der Zelloberfläche durch Einfügen einer Signalsequenz steigern ließe. Dieser Effekt wurde beim humanen GPCR CB1 beobachtet. Dieser besitzt einen langen N-Terminus (116 Aminosäuren) ohne Signalpeptid. Durch Einfügen einer Signalsequenz konnte die Expression des Rezeptors deutlich erhöht werden, ohne dabei seine Funktion zu beeinträchtigen [107]. Eine transfizierte, hochexprimierende Zelllinie könnte ebenfalls bei der Generierung von mAks gegen Zelloberflächenrezeptoren wie RAI3 zum frühzeitigen Screening der Hybridomazellen eingesetzt werden, um somit spezifisch zellbindende Antikörper zu selektieren. Neben durchflusszytometrischen Analysen könnten dafür auch Zell-basierte ELISA eingesetzt werden. Auch eine Kombination aus Screening-Methoden auf Zelllinien und rekombinantem Protein ist dabei denkbar. Stabile Transfektanten könnten ebenfalls direkt zur Immunisierung der Mäuse eingesetzt werden um somit die Wahrscheinlichkeit der Gewinnung von RAI3-spezifischen Antikörpern, die an die Zelloberfläche binden, zu erhöhen. Eine Kontrolle auf untransfizierten Zellen ist dabei unabdingbar um unspezifisch bindende Antikörper auszuschließen. Eine weitere alternative Methode ist der Einsatz des „Phage-Display“ Verfahrens. Diese Methode ermöglicht die Präsentation von humanen scFvs oder Fab-Fragmenten in Fusion mit Hüllproteinen an der Oberfläche von filamentösen Phagen. Durch den Einsatz humaner V-Gen Bibliotheken können so humane Antikörperfragmente generiert werden. Eine anschließende Isolation der V-Gene ermöglicht auch eine direkte Reformatierung in ein komplettes humanes IgG-Format.

Bisher kommerziell verfügbare Antikörper gegen RAI3 sind zum Einen polyklonal und wurden zum Anderen mittels Peptid-Immunisierung hergestellt. Im Rahmen dieser Arbeit konnten erstmals monoklonale Antikörper gegen das rekombinante Vollängenprotein hergestellt werden. Da mAks nur ein spezifisches Epitop erkennen, haben sie gegenüber

polyklonalen Antikörpern den Vorteil, dass unspezifische Kreuzreaktionen unwahrscheinlicher sind. Gerade im Bezug auf eine zuverlässige pathologische Untersuchung von Tumorgewebe oder der Entwicklung von therapeutischen Antikörpern sind sie daher eindeutig besser geeignet. Zusätzlich kann es bei polyklonalen Antikörpern zu enormen Unterschieden zwischen den einzelnen Herstellungsansätzen kommen. Da mAKs aus einzelnen Hybridomazellen gewonnen werden, sind konstante Bindungseigenschaften von Präparation zu Präparation gewährleistet. Der mAK 24 2.3 zeigte die besten Signale bei der Etablierung der Immunhistochemie und detektiert RAI3 spezifisch in Paraffin-eingebettetem Gewebe (Abbildung III-14), was einen Einsatz in der pathologischen Routine möglich macht. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde er für die Färbung eines TMA bestehend aus Mammakarzinom und Mamma-Normalgeweben ausgewählt.

IV.1.2 Diagnostische Relevanz von RAI3

Die Identifizierung zuverlässiger, neuer Biomarker für die Krebsdiagnose und -prognose sind von großer Bedeutung für die moderne individualisierte Krebstherapie. Eines der bekanntesten und wichtigsten Tumorantigene bei Brustkrebs ist Her2/neu. Dieser Marker wird bei 15-30 % [54] der invasiven Mammakarzinome überexprimiert und geht mit einer schlechten Prognose einher. Die Bestimmung des Her2-Status ist daher eine der wichtigsten Routine-Untersuchung beim Mammakarzinom. Diese Untersuchung ermöglicht ebenfalls die Auswahl einer Anti-Her2 Therapie mittels des humanisierten mAK Trastuzumab (Herceptin®), die nur bei vorliegender Her2 Hochregulierung erfolgsversprechend eingesetzt wird. Allerdings kommt es auch hier bei den meisten Patienten zur Entwicklung einer Resistenz gegenüber der Herceptin-Therapie [59]. Aus diesem Grund ist die Identifizierung und Verifizierung neuer Tumormarker beim Mammakarzinom von besonders großer Bedeutung. Darauf basierend kann die Diagnose verbessert und Grundlagen für die Entwicklung neuer bzw. ergänzender Therapieoptionen gelegt werden. Eine intensive Analyse der potentiellen Kandidaten ist im Vorfeld nötig. Erste Untersuchungen anhand von cDNA-„microarrays“ geben wertvolle Hinweise über eine vorliegende Hochregulierung eines Gens im Tumorgewebe. Um eindeutige Erkenntnisse über die tatsächliche Relevanz des Antigens festzustellen, ist vor allem die Untersuchung auf Proteinebene notwendig. Der GPCR RAI3 könnte vor allem aufgrund seiner angenommenen Expression an der Zellmembran ein möglicher Kandidat für ein neues Tumorantigen beim Mammakarzinom sein. Allerdings ist die genaue Funktion des Rezeptors sowohl bei normalen als auch bei malignen Zellen bisher nicht genau bekannt und wird kontrovers diskutiert [44, 47]. Mittels der generierten Antikörper, im Speziellen mAK 24 2.3, konnte eine systematische Analyse von Mammakarzinomgeweben und Mamma-Normalgeweben in einem TMA mittels

Immunhistochemie erfolgen (III.1.14). Basierend auf bisherigen Untersuchungen zu RAI3 konnte eine Hochregulierung des Rezeptors auf mRNA-Ebene in verschiedenen Brustkrebsgeweben und -zelllinien nachgewiesen werden [44, 47]. Es gibt jedoch keine Studienergebnisse, die auf einer vergleichbaren Untersuchung der RAI3-Proteinexpression basiert. Die hier gezeigte Studie ist somit die erste große Untersuchung der RAI3 Proteinexpression im Mammakarzinomgewebe. In einer Untersuchung der *RAI3* Expression auf mRNA Ebene wurde mittels quantitativer RT-PCR in sechs von elf Brustkrebszelllinien sowie in 19 von 25 Brustkrebsgeweben im Vergleich zum Normalgewebe ein erhöhtes RAI3-Level detektiert [44]. Auch eine Untersuchung, die im Rahmen der Kooperation mit dem Uniklinikum Aachen durchgeführt wurde, zeigte in einer cDNA Dot blot Hybridisierungs-Analyse eine RAI3 Überexpression in 60% der untersuchten Proben (n=50; Tumor versus Normal) [109]. In der durchgeführten TMA Analyse bestehend aus Proben von 157 Brustkrebs und 44 Brust-Normalgeweben konnten wir jedoch keinen statistisch signifikanten Unterschied in der RAI3 Expression zwischen Tumor- und Normalgewebe feststellen. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung kann in der Präparation der analysierten Proben liegen. Die präparierten Gewebeproben für mRNA Analysen beinhalten neben den eigentlichen zu untersuchenden Zellen immer auch einen gewissen Anteil an Bindegewebsmaterial, welches RAI3-negativ ist. Dieser Anteil kann bei Normalgeweben im Vergleich zu Tumorgeweben höher ausfallen und daher das Gesamtlevel der RAI3 Expression verringern. In der Untersuchung der Proteinexpression an Gewebeschnitten werden jedoch die Epithelzellen des Tumorgewebes direkt mit denen des Normalgewebes verglichen. Der störende Einfluss des Bindegewebes kann daher ausgeschlossen werden. Analysen zur Vergleichbarkeit von mRNA Analysen und korrespondierender Proteinexpression zeigten auch bei Untersuchungen des Adenokarzinoms und humaner Monozyten Diskrepanzen in den Ergebnissen [110, 111]. Neben technisch begründeten Fehlerquellen können vor allem auch posttranskriptionales Splicing oder Modifikationen die Proteintranslation beeinflussen und somit zu unterschiedlichen Expressionslevels führen [111, 112]. Bei Expressionsuntersuchungen, die allein auf der Analyse von Zelllinien basieren, kann es aufgrund des unterschiedlichen physiologischen Status der Zelllinien zu Fehlinterpretationen kommen. Vor allem das Zellalter und die Zusammensetzung der Zellkulturmedien kann die Proteinexpression beeinflussen [113]. Im Speziellen wurde gezeigt, dass die RAI3 Expression durch Supplementierung des Kulturmediums mit Serum induziert wird. Daher weisen die Autoren auf die Gefahr der Fehlinterpretation der Expressionsdaten hin, sollten Normalzellen unter unterschiedlichen Bedingungen als Tumorzellen kultiviert werden, zum Beispiel ohne Serum [114]. In der in dieser Arbeit gezeigten Untersuchung hingegen können derartige Einflüsse ausgeschlossen werden, da sie auf der Analyse von Gewebematerial beruhen. In einer anderen Studie wurde die RAI3

Expression mittels cDNA Microarray und RT-PCR in 20 Östrogenrezeptor-negativen Mammakarzinomgeweben untersucht. Dabei wurde eine die *RAI3* Expression in der Gruppe (n=10) von Patienten mit einer Überlebenszeit von weniger als fünf Jahren als hochreguliert detektiert und damit als eines der Gene identifiziert, die mit einer schlechten Prognose korrelieren [60]. Allerdings ist hier aufgrund der kleinen Anzahl an untersuchten Proben, die Signifikanz der Ergebnisse in Frage zu stellen. In unserer Untersuchung, die auf einer wesentlich größeren Probenanzahl beruht, konnte eine derartige Korrelation zwischen *RAI3*-Expression und Überleben der Patienten nicht bestätigt werden.

Im Gegensatz zu den bereits dargestellten Ergebnissen wurde *RAI3* als Tumorsuppressor bei Lungenkrebs identifiziert. Diese Ergebnisse basieren auf einer „knock-out“ Maus-Studie, bei der deutlich mehr Lungentumore in den „knock-out“ Mäusen im Vergleich zu wildtyp Mäusen ausgebildet wurden. Eine mRNA Analyse zeigte zusätzlich eine Reduktion der *RAI3* Expression in elf von 18 humanen Lungentumorgeweben [47].

Die tatsächliche Bedeutung von *RAI3* als Tumormarker ist nach unseren Untersuchungen nicht eindeutig und wirft auch durch die kontroversen Ergebnisse anderer Gruppen noch viele Fragen auf. Weitere Studien basierend auf gepaarten Tumor- und Normalgewebeproben aus einem Patienten könnten nähere Hinweise liefern. Die im Rahmen der Kooperation durchgeführte „Cancer Profiling Array“ Analyse basierte auf Gewebspaaren und zeigte hier eine eindeutige Hochregulation. Eine Aufklärung der genauen Funktion und die Identifikation den Rezeptorliganden sind ebenfalls hilfreich. Der monoklonale anti-*RAI3* Antikörper 24 2.3 könnte für die weitere Analyse des Rezeptors von großer Bedeutung sein und für die Untersuchung von großen Sammlungen an Geweben unterschiedlichen Ursprungs eingesetzt werden. Damit können weitere wertvolle Hinweise auf die Bedeutung von *RAI3* und die Verifizierung von *RAI3* als Tumorantigen und als potentielles Zielantigen für eine Antikörper-basiert Therapie gewonnen werden.

IV.2 fAChR als neues Zielantigen für Immuntoxine

IV.2.1 Herstellung und *in vitro* Charakterisierung des anti-fAChR Immuntoxins

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neues fAChR-spezifisches Immuntoxin rekombinant hergestellt und funktional charakterisiert. Das Immuntoxin scFv35-ETA' setzt sich aus einem humanen Autoantikörper-basiertem scFv und einer verkürzten Version des etablierten bakteriellen Endotoxin A aus *P. aeruginosa* zusammen. Basierend auf den Protokollen von Barth *et al.* wurde eine Fermentation im *E.coli* Stamm Rosetta2 (DE3) unter Zusatz von Stressfaktoren und kompatiblen Soluten durchgeführt [115]. Das gewählte Vektorsystem, welches auf den pET Vektoren basiert ermöglicht den Transport des rekombinanten Proteins

ins Periplasma, aus dem es unter nativen Bedingungen isoliert werden kann. Die Reinigung erfolgte mittels etablierter Methoden wie IMAC, Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltrationsverfahren. Auf diese Weise konnten aus 4 L Fermentationsvolumen 10 mg sauberes, rekombinantes Protein gewonnen werden. Allerdings mussten unter den erforderlichen stringenten Waschbedingungen auch große Proteinverluste hingenommen werden, sodass die tatsächliche Proteinausbeute deutlich höher liegt und durch weitere Optimierung der Reinigungsverfahren, wie Änderung der Pufferbedingungen und Säulenmatrices, gesteigert werden kann. Durch die Abtrennung von Proteinaggregaten in der Gelfiltration lag letztlich eine saubere monomere Proteinlösung vor, die für die funktionale Charakterisierung eingesetzt wurde (Abbildung III-20). Für die Charakterisierung des Immuntoxins konnte auf fünf verschiedene RMS Zelllinien zugegriffen werden. Darunter drei Zelllinien des embryonalen Subtyps und zwei des alveolären Subtyps, einer aggressiveren Form des RMS. In der Durchflusszytometrie konnte die spezifische Bindung des Immuntoxins scFv35-ETA' an alle fünf fAChR-positiven Zelllinien nachgewiesen werden, was eine erste wichtige Grundvoraussetzung für ein funktionales Immuntoxin ist. Die Messung der Bindungsaffinität der Immuntoxine erfolgte ebenfalls mittels Durchflusszytometrie auf drei verschiedenen Zelllinien (Abbildung III-22). Die K_d -Werte lagen mit durchschnittlich 4,2 nM in einem vergleichbaren Rahmen wie für andere scFv-Konjugate beschrieben [116]. Die Affinität des Immuntoxins spielt eine große Rolle, da sie maßgeblich die Verweildauer des Immuntoxins auf der Zelloberfläche bestimmt. Eine Erhöhung der Affinität könnte daher das toxische Potential des Immuntoxins steigern. Eine Möglichkeit dazu ist die *in vitro* Affinitätsreifung durch zielgerichtete Mutationen in den CDR-Regionen [3, 117]. Eine alternative Möglichkeit ist die Erhöhung der Bindungvalenz durch Einfügen eines zweiten scFv oder der Generierung eines bivalenten F(ab')₂-Fragmentes. Derartige Konstrukte werden ebenfalls erfolgreich als Immuntoxine eingesetzt und zeigen im direkten Vergleich eine bis zu 18-fache Steigerung der Zytotoxizität [118-121]. Allerdings ist bezüglich der klinischen Anwendung zu berücksichtigen, dass sich ein höheres Molekulargewicht wiederum negativ auf die Tumorpenetration auswirken kann [122, 123]. Aus diesem Grund könnte der Einsatz bivalenter scFvs die vorzuziehende Alternative sein. Hinsichtlich der pharmakokinetischen Eigenschaft, wurden monovalente sowie bivalente scFv untersucht und verglichen. Dabei zeigte sich eindeutig die Verbesserung der Tumorpenetration und -retention des bivalenten (scFv)₂ im Vergleich zum monovalenten scFv [122]. Die Verdopplung der Valenz könnte sich ebenfalls positiv auf das Internalisierungsverhalten des Immuntoxins auswirken. Der scFv35-ETA' wurde mittels Durchflusszytometrie auf verschiedenen Zelllinien auf das Internalisierungsverhalten hin untersucht. Auf allen untersuchten Zelllinien waren nach zwei Stunden 80% des Immuntoxins internalisiert. Die Untersuchungen des zytotoxischen Potentials des Immuntoxins wurde im Anschluss an allen

zur Verfügung stehenden fAChR-positiven Zelllinien im XTT-Proliferationstest untersucht (Abbildung III-25). Dabei zeigte sich eine spezifische Inhibition des Zellwachstums auf allen fAChR-positiven Zelllinien, wobei die Kontrollzelllinien nur unwesentlich beeinflusst wurden. Auch der Vergleich mit einem unspezifischen Immuntoxin (H22-ETA') bestätigte die spezifische Wirkung. Es zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede in der Effektivität des Immunttoxins zwischen den einzelnen Zelllinien. Auf den embryonalen RMS Zelllinien FL-OH-1 und RD zeigten sich mit 0,13 und 1,5 nM die niedrigsten IC_{50} -Werte und damit die höchste Effektivität des scFv35-ETA'. Bei der alveolären RMS-Zelllinie RH-30 zeigte sich mit einer IC_{50} von 113 nM die geringste Empfindlichkeit für scFv35-ETA'. Eine mögliche Erklärung der schlechten Effektivität auf dieser Zelllinie ist das niedrige Expressionslevel des Zielantigens fAChR, welches sich sowohl in der RT-PCR Analyse als auch in der Durchflusszytometrie zeigte (Abbildung III-16, Abbildung III-21). Dieser Zusammenhang wurde bereits in einer Untersuchung eines Interleukin-4 Rezeptor-spezifischen Immunttoxins beobachtet [124]. Die anderen RMS-Zelllinien zeigten jedoch keine deutlichen Unterschiede in der Rezeptorexpression, sodass hier andere Faktoren verantwortlich sein müssen. Derartige Unterschiede bezüglich der Toxizität von Immuntoxinen auf Zelllinien unabhängig von der Rezeptorexpression wurde auch von einer anderen Gruppe beobachtet. In einer Untersuchung zu einem EpCAM-spezifischen Immuntoxin, zeigte sich gerade diejenige Zelllinie am resistentesten, die die höchste Rezeptordichte aufwies [32]. Dies weist auf rezeptorunabhängige, zellspezifische Faktoren hin, die die Effektivität des Immuntoxins beeinflussen können. In einer weiteren Untersuchung des scFv35-ETA' konnte die Induktion von Apoptose auf RD Zellen durch das Immuntoxin nachgewiesen werden. Dies weist zusätzlich darauf hin, dass es durch das Immuntoxin scFv35-ETA' nicht lediglich zu einer Stagnation des Zellwachstums kommt, sondern die Zellen gezielt getötet werden. Insgesamt sind die erzielten *in vitro* Toxizitäten basierend auf den IC_{50} -Werten bei der Zelllinien FL-OH-1 als hoch, bei RD als mittel und bei den restlichen Zelllinien als gering einzustufen. Andere veröffentlichte ETA-basierte Immunttoxine zeigen ein breites Spektrum von Toxizitäten, ebenfalls mit zellspezifischen Unterschieden. Dabei liegen viele in einem vergleichbaren Rahmen mit IC_{50} -Werten zwischen 0,04 und 0,6 nM [87, 125-128]. Es konnten jedoch zum Teil auch noch höhere Toxizitäten mit IC_{50} -Werten im niedrigen picomolaren Bereich erzielt werden [129, 130]. Die oben beschriebene Erhöhung der Affinität ist eine vielversprechende Möglichkeit zur Verbesserung dieses Immunttoxins auch hinsichtlich der Zytotoxizität und wurde bereits für andere Immunttoxine beschrieben [117, 131].

Das hier untersuchte Immuntoxin scFv35-ETA' konnte erfolgreich in *E.coli* produziert und aus dem Periplasma gereinigt werden. Die funktionale Charakterisierung ergab eine spezifische Bindung an fAChR-positive Zelllinien mit einer hohen Affinität und einer niedrigen

K_D von circa 4,2 nM. Das Immuntoxin wurde dabei schnell internalisiert und zeigte spezifische toxische Wirkung auf fAChR-positive Zelllinien. Damit ist das Immuntoxin scFv35-ETA' ein interessanter Kandidat für die weitere präklinische Entwicklung zur Therapie des Rhabdomyosarkoms.

IV.2.2 Therapeutische Anwendung des scFv35-ETA'

Zahlreiche ETA-basierte Immuntoxine für verschiedene Krebsindikationen befinden sich zurzeit in der präklinischen Entwicklung oder finden bereits Anwendung in klinischen Studien. Vor allem bei hematologischen Krebserkrankungen konnten bereits große Behandlungserfolge erzielt werden. Das Immuntoxin BL22 ist ein Beispiel für ein erfolgreiches ETA-basiertes Immuntoxin, welches gegen CD22 gerichtet ist und bereits große Erfolge in aktuellen klinischen Studien bei der Haarzell-Leukämie erzielen konnte [132]. Aber auch für solide Krebserkrankungen wie Pankreas [133] oder Brustkrebs [134] gibt es zahlreiche Ansätze für neue Immuntoxine in der klinischen Entwicklung.

Für RMS sind derzeit keine spezifischen Immuntoxine beschrieben. Aufgrund der schlechten Prognose vor allem bei metastatisiertem RMS stellen neue Therapieansätze eine vielversprechende Erweiterung dar [70, 71]. Da RMS jedoch eine eher seltene Erkrankung ist, steht sie nicht im Fokus der Pharmaindustrie, was die Hoffnung auf neue Therapieansätze minimiert. Die Identifizierung von fAChR als spezifischen, hochregulierten Marker des RMS ermöglicht nun erstmals die Entwicklung einer zielgerichteten Immuntherapie [72]. Aus cDNA Bibliotheken aus MG Patienten konnten humane Fab-Fragmente gewonnen werden, die spezifisch an die γ -Untereinheit des fAChR binden. Der daraus generierte humane scFv35 ist daher eine optimale Bindedomäne für ein RMS spezifisches neues Immuntoxin [98]. Basierend auf diesen scFv35 wurden bereits chimere T-Zellen mit modifiziertem T-Zell Rezeptor generiert. Diese Tragen den scFv35 in Fusion mit der ζ -Kette des T-Zell Rezeptors und zeigten spezifische Zytotoxizität gegenüber fAChR-positiven RMS Zellen *in vitro* [85]. Bei einem therapeutische Einsatz eines scFv35-basierten Immuntoxins ist von einer minimalen unspezifischen Toxizität auszugehen, da das Zielprotein fAChR eine nahezu exklusive Expression auf RMS Zellen aufweist [135]. Die Spezifität wird vor allem durch die Beobachtung verdeutlicht, dass einige Mütter, die Autoantikörper gegen die γ -Untereinheit des fAChR ausbildeten selbst asymptomatisch blieben, wohingegen die Kinder mit Arthrogryposis multiplex congenita, einer schweren angeborenen Gelenksteife geboren wurden, welche auf diese Antikörper zurückzuführen war [136]. Zusätzlich wurde in schwangeren MG Patientinnen ein deutlich höherer Anteil an fAChR-Antikörpern detektiert, was auf eine spezifische Immunisierung der Patientinnen mit dem fetalen Rezeptor hinweist [79]. Da der fAChR jedoch auch im Thymus exprimiert wird,

werden fAChR-spezifische Autoantikörper zu einem geringen Anteil auch bei nicht-schwangeren MG-Patientinnen und MG-Patienten gebildet. Diese scheinen jedoch nicht an der Krankheitssymptomatik beteiligt zu sein [77].

In dem im Rahmen der Kooperation mit der Universität Würzburg durchgeführten ersten *in vivo* Mausmodell konnte durch Behandlung mit scFv35-ETA' eine deutliche Wachstumsinhibition des Tumors erzielt werden. Allerdings war diese Inhibition reversibel und das Wachstum nahm nach Absetzen der Behandlung wieder stark zu [98]. Diese Ergebnisse zeigen zwar die *in vivo* Funktionalität des Immuntoxins, jedoch ist diese nicht ausreichend für eine Monotherapie. Ein Zusammenhang könnte zum Einen mit der eher mittleren Toxizität des Immuntoxins auf der RMS Zelllinie RD *in vitro* und zum Anderen mit einer zu geringen Serumstabilität bestehen. Ansätze zur Erhöhung der Affinität wie oben beschrieben könnten sich auch positiv auf die *in vivo* Applikation auswirken. Außerdem ist bei subkutanen Tumormodellen eine mögliche limitierte Vaskularisierung der Tumore zu berücksichtigen, die sich negativ auf die systemische Therapie auswirken kann. Eine vielversprechende Ergänzung stellt jedoch die Kombination der Immuntoxinbehandlung mit Chemotherapie dar. Aktuelle Publikationen zeigen, dass es dabei zu synergistischen Effekten kommen kann, die eine effektive Tumoreliminierung ermöglichen [124, 137, 138]. Dieser Ansatz ist bei einem fAChR-gerichteten Immuntoxin vor allem deswegen interessant, da eine Hochregulierung der Rezeptorexpression nach Chemotherapie sowohl *in vitro* als auch in Patientenmaterial nachgewiesen werden konnte [85, 139]. Eine solche Kombination aus Chemotherapie mit einer scFv35-ETA'-Immuntherapie könnte daher eine optimale Effektivität gegen das RMS erzielen und ein erfolgreich in zukünftigen Analysen eingesetzt werden.

IV.3 Ausblick

IV.3.1 Monoklonale Antikörper gegen RAI3

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mAk gegen RAI3 generiert und bezüglich ihrer Bindungsaktivität und Spezifität charakterisiert. Die Herstellung erfolgte mittels Immunisierung mit einer Proteinpräparation, bei der das rekombinante Protein intergriert in Liposomen vorlag, um die korrekte Faltung des Proteins zu gewährleisten. Die untersuchten Antikörper weisen eine hohe Spezifität auf und detektieren sowohl das rekombinante, gereinigte Protein im ELISA als auch im Kontext von Zellysaten, Gewebelysaten und ganzen Zellen mittels Western Blot und Immunofluoreszenz. Eine Analyse in der Durchflusszytometrie zeigte jedoch keinerlei Bindung der Antikörper an Zelloberflächen. Hinsichtlich eines möglichen therapeutischen Nutzens wäre diese jedoch unabdingbar.

Daher wären zielgerichtete Immunisierungs- und Screeningstrategien denkbar, bei denen zukünftig gezielt Antikörper isoliert werden könnten, die an die Zelloberfläche binden. Dazu müsste untersucht werden, ob sich die Orientierung des Proteins in die Liposomen so beeinflussen lässt, dass die extrazellulären Domänen nach außen gerichtet vorliegen. Eine andere Alternative ist lediglich eine Adaptierung der Screeningverfahren. Hierzu könnten Hybridomaüberstände bereits in einem sehr frühen Stadium der Selektion auf die Bindung an Zielzellen untersucht werden, so dass gezielt diese Klone selektiert werden. Dazu könnten Zell-ELISA etabliert werden, die eine einfache Handhabung gewährleisten. Basierend auf den hier dargestellten Ergebnissen aus der TMA Analyse konnte beim Mammakarzinom keine Hochregulierung des Rezeptors im Vergleich zum Normalgewebe detektiert werden. Die generierten anti-RAI3 Antikörper könnten nun für weitere Studien dieser Art eingesetzt werden um näheren Aufschluss über die tatsächliche Bedeutung von RAI3 bei Tumorerkrankungen zu gewinnen. Dabei wäre vor allem eine TMA Analyse mit Lungentumor- und Normalgewebe interessant, da hier eine Suppressorfunktion vermutet wird. Eine Bestätigung dieser Beobachtung würde ein anderes Licht auf diesen Rezeptor werfen. Im Rahmen einer Kooperation mit dem Garvan Institut, Sydney wird zur Zeit die Etablierung der Immunhistochemie mit den hier gezeigten Antikörpern an Pankreasgewebe durchgeführt. Auch hier konnten die Gewebe erfolgreich spezifisch gefärbt werden. Die Ergebnisse aus einer TMA-Analyse sollen mit bereits gewonnenen Daten aus *in situ*-Hybridisierungsstudien verglichen werden. Die spannenden Erkenntnisse daraus bleiben abzuwarten.

IV.3.2 Immuntoxine gegen fAChR

Das fAChR-spezifische Immuntoxin scFv35-ETA' wurde im Rahmen dieser Arbeit produziert und hinsichtlich Spezifität, Affinität, Internalisierung, Zytotoxizität und Serumstabilität untersucht. Aufgrund seiner hohen Spezifität und demonstrierten Toxizität *in vitro* und *in vivo* ist es ein vielversprechender Kandidat für die präklinische Weiterentwicklung. Neben bereits beschriebenen Möglichkeiten zur Erhöhung der Affinität und Stabilität und damit auch der Zytotoxizität ist auch die Humanisierung des Konstruktes ein weiterführendes Ziel. Dies ist vor allem hinsichtlich einer wiederholten und langandauernden Behandlung von großem Vorteil. Bei der klinischen Anwendung von ETA-basierten Immuntoxin, kommt es bei über 50 bis 100 % der behandelten Patienten mit soliden Tumoren bereits nach einem Zyklus zu einer Immuntoxin-spezifischen Immunreaktion [30]. Die Bildung neutralisierender Antikörper kann dabei den Behandlungserfolg maßgeblich beeinflussen. Durch die Humanisierung würde sich die Immunogenität des Immuntoxins deutlich reduzieren. Da das Immuntoxin bereits auf dem humanen scFv35 basiert, ließe sich durch Austausch der toxischen Domäne

eine einfache Humanisierung realisieren. Als toxische Domäne sind hierbei humane RNasen wie Angiogenin oder die Serinprotease Granzym B denkbar, die bereits erfolgreich als Immuntoxine eingesetzt werden [140-143]. Weiterhin sollte bei zukünftigen Analysen der Fokus auf die pharmakokinetischen Eigenschaften des Immuntoxins gelegt werden. Eine Analyse der Serumhalbwertszeit *in vivo* würde näheren Aufschluss über die tatsächliche *in vivo* Stabilität und Verfügbarkeit geben. Vor allem bei der Therapie solider Tumoren spielen diese Faktoren eine große Rolle, da diese für das Immuntoxin schwer erreichbar sind. Wird es zu schnell aus dem Serum eliminiert oder ist es an sich instabil und wird schnell abgebaut, kann es kaum den Tumor und damit seinen eigentlichen Wirkort erreichen.

Weiterhin sollte die Wirkung verschiedener Chemotherapeutika auf die Expression des fAChR genauer untersucht werden. Mittels quantitativer PCR könnten diejenigen Substanzen identifiziert werden, die den stärksten Effekt auf die Expressionrate der gamma-Untereinheit haben. Ein nächster Schritt würde die Kombination der beiden Stoffe in einem Toxizitätstest beinhalten. Bei erfolgreicher Demonstration eines synergistischen Effektes könnten diese Erkenntnisse auf ein *in vivo* Modell übertragen werden.

Das Immuntoxin scFv35-ETA' könnte neben einem möglichen Einsatz zur Therapie des RMS auch für andere Krebserkrankung relevant werden. So konnte kürzlich die rhabdoide Transdifferenzierung von Metastasen des malignen Melanoms mit rhabdoiden Markern, darunter fAChR identifiziert werden [73]. Daher wäre bei Verfügbarkeit geeigneter Zelllinien oder Zugriff auf Primärmaterial eine Untersuchung der Bindung und Toxizität des Immuntoxins von großem Interesse.

V ZUSAMMENFASSUNG

Monoklonale Antikörper und Antikörperfusionsproteine haben einen immer größer werdenden Stellenwert in der pharmazeutischen Industrie. Vor allem in der Diagnose und Behandlung von Krebs finden sie ein breites Anwendungsspektrum. Aufgrund ihrer Spezifität sind sie ideale Moleküle um Wirkstoffe zielgerichtet zum Wirkort zu transportieren oder spezifische Tumormarker zu identifizieren und damit wichtige Hinweise bezüglich der Diagnose und Prognose einer Krebserkrankung zu gewinnen. Die Suche nach neuen tumorassoziierten Molekülen oder Tumormarkern, die mittels Antikörper adressiert werden können, bleibt dabei eine der wichtigsten und schwierigsten Herausforderung.

Ziel dieser Arbeit war die Generierung und Charakterisierung mAk gegen ein solches potentiell Tumorantigen. Dieses Antigen RAI3 gehört zur Familie der GPCRs eine der größten und vielfältigsten Rezeptorfamilien überhaupt. Aktuelle Untersuchungen unterstreichen eine besondere Rolle von RAI3 beim Wachstum des Mammakarzinoms und machen es zu einem potentiellen Kandidaten für eine Antikörper-basierte Therapie oder eines diagnostisch relevanten Markers. Die exakte Funktion des Rezeptors ist jedoch bisher nicht genau bekannt und wird kontrovers diskutiert. Mittels Immunisierung von BALB/c Mäusen mit dem Volllängeprotein integriert in Liposomen und klassischer Hybridomatechnologie konnten fünf mAk gegen RAI3 isoliert werden. Diese wurden mittels ELISA, Western Blot und Immunofluoreszenz auf ihre spezifischen Bindungseigenschaften sowohl an gereinigtem Protein als auch an Zellen und Zelllysaten untersucht. Alle untersuchten mAk zeigten eine hohe Spezifität und Affinitäten im nanomolaren Bereich. Eine Bindung der Antikörper an die Zelloberfläche RAI3-positiver Zellen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Daher wurde im Folgenden eine Untersuchung der Antikörper für die Tumordiagnostik an Tumorgewebe angestrebt. Nach erfolgreicher Etablierung der Immunhistochemie mittels der anti-RAI3 mAks an Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten wurde der mAk 24 2.3 für die folgende Analyse von 147 Mammakarzinom und 44 Mamma-Normalgewebe in einem TMA ausgewählt. Die pathologische Auswertung des TMA zeigte eine verbreitete Expression von RAI3 im Tumorgewebe. Allerdings konnte keine Überexpression auf Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe und keine Korrelation zwischen der RAI3 Expression und der Prognose basierend auf der Gesamtüberlebenszeit und der Rezidiv-freien Überlebenszeit festgestellt werden. Basierend auf den Ergebnissen dieser ersten veröffentlichten TMA-Studie der RAI3 Expression beim Mammakarzinom bleibt die tatsächliche Signifikanz von RAI3 als Tumormarker uneindeutig. Mittels der hier generierten Antikörper könnte durch weitere Studien dieser Art ein wichtiger Beitrag zur

Aufklärung der Rezeptorfunktion und dessen Bedeutung bei anderen Krebserkrankungen geleistet werden.

Da eine Entwicklung der RAI3-Antikörper als therapeutische Antikörper aufgrund der fehlenden Bindung an der Zelloberfläche nicht möglich war, wurde die Arbeit mit der Untersuchung eines neuen Immuntoxins ergänzt. In diesem zweiten Teil der Arbeit wurde das fAChR-spezifische Immuntoxin, scFv35-ETA' produziert und funktional charakterisiert. Der fAChR ist die fetale Form des nikotinischen AChR und wurde bereits als spezifischer Marker beim RMS identifiziert. Das RMS ist eine seltene Tumorerkrankung des Muskelgewebes und ist die häufigste Weichteiltumorerkrankung bei Kindern. Das beschriebene Immuntoxin besteht aus dem humanen scFv35 basierend auf einem Autoantikörper und einer deletierten Version des ETA'. Dieses Immuntoxin wurde in *E.coli* erfolgreich exprimiert und aus Zelllysaten gereinigt. Im Anschluss erfolgte die funktionale Charakterisierung hinsichtlich der Spezifität, Affinität und Zytotoxizität. Die Analysen bestätigten eine spezifische Bindung des Immuntoxins mit hoher Affinität ($K_d=4,3$ nM) auf RMS-Zelllinien sowohl des embryonalen als auch des alveolären Subtyps. Im XTT-Proliferationstest konnte die spezifische Inhibition des Zellwachstums fAChR-positiver Zelllinien demonstriert werden, die sich durch Inkubation mit scFv35 ohne toxische Domäne inhibieren ließ. Die verschiedenen Zelllinien zeigten dabei unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber dem Immuntoxin mit IC_{50} -Werten zwischen 0,13 nM (FL-OH-1) und 113 nM (RH30). Eine weitere Analyse bezüglich der toxischen Wirkung des Immuntoxins bestätigte weiterhin die Induktion von Apoptose. Das in dieser Arbeit untersuchte Immuntoxin konnte bereits im Rahmen einer Kooperation in einem ersten *in vivo* Mausmodell untersucht werden in dem eine deutliche Hemmung des Tumorwachstums beobachtet wurden. Diese vielversprechenden Ergebnisse zeigen das Potential dieses neuen Immuntoxins und machen es zu einem interessanten Kandidaten für die weitere präklinische und klinische Weiterentwicklung. Basierend auf dem humanen scFv35 können durch Fusion mit humanen Toxinen oder anderen Effektormolekülen vollständig humane Immuntoxine entwickelt werden. Auch das Anwendungsfeld fAChR-spezifischer Immuntoxine könnte sich aufgrund neuester Beobachtungen der rhabdoïden Transdifferenzierung von metastatisiertem Melanom zukünftig erweitern.

VI LITERATURVERZEICHNIS

1. *Cancer*. WHO Fact Sheet No 297 2009; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>.
2. Chabner, B.A. and T.G. Roberts, Jr., *Timeline: Chemotherapy and the war on cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(1): p. 65-72.
3. Carter, P.J., *Potent antibody therapeutics by design*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(5): p. 343-57.
4. Strebhardt, K. and A. Ullrich, *Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress*. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(6): p. 473-80.
5. Carter, P., L. Smith, and M. Ryan, *Identification and validation of cell surface antigens for antibody targeting in oncology*. *Endocr Relat Cancer*, 2004. **11**(4): p. 659-87.
6. Bouche, O., et al., *The role of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody monotherapy in the treatment of metastatic colorectal cancer*. *Cancer Treat Rev*, 2010. **36 Suppl 1**: p. S1-10.
7. Fenton, C. and C.M. Perry, *Spotlight on gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukaemia*. *BioDrugs*, 2006. **20**(2): p. 137-9.
8. Walter, R.B., et al., *CD33 expression and P-glycoprotein-mediated drug efflux inversely correlate and predict clinical outcome in patients with acute myeloid leukemia treated with gemtuzumab ozogamicin monotherapy*. *Blood*, 2007. **109**(10): p. 4168-70.
9. Allen, T.M., *Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(10): p. 750-63.
10. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. *Nature*, 1975. **256**(5517): p. 495-7.
11. Almagro, J.C. and J. Fransson, *Humanization of antibodies*. *Front Biosci*, 2008. **13**: p. 1619-33.
12. Carter, P., *Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies*. *Nat Rev Cancer*, 2001. **1**(2): p. 118-29.
13. Lonberg, N., *Fully human antibodies from transgenic mouse and phage display platforms*. *Curr Opin Immunol*, 2008. **20**(4): p. 450-9.
14. Jain, M., N. Kamal, and S.K. Batra, *Engineering antibodies for clinical applications*. *Trends Biotechnol*, 2007. **25**(7): p. 307-16.
15. Weisser, N.E. and J.C. Hall, *Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics*. *Biotechnol Adv*, 2009. **27**(4): p. 502-20.
16. Schmidt, S.R., *Fusion-proteins as biopharmaceuticals--applications and challenges*. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2009. **12**(2): p. 284-95.
17. Pastan, I., *Immunotoxins containing Pseudomonas exotoxin A: a short history*. *Cancer Immunol Immunother*, 2003. **52**(5): p. 338-41.
18. Pastan, I., et al., *Immunotoxin treatment of cancer*. *Annu Rev Med*, 2007. **58**: p. 221-37.
19. Teicher, B.A., *Antibody-drug conjugate targets*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2009. **9**(8): p. 982-1004.
20. Iglewski, B.H., P.V. Liu, and D. Kabat, *Mechanism of action of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A: adenosine diphosphate-ribosylation of mammalian elongation factor 2 in vitro and in vivo*. *Infect Immun*, 1977. **15**(1): p. 138-44.
21. Carroll, S.F. and R.J. Collier, *Active site of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A. Glutamic acid 553 is photolabeled by NAD and shows functional homology with glutamic acid 148 of diphtheria toxin*. *J Biol Chem*, 1987. **262**(18): p. 8707-11.
22. Hwang, J., et al., *Functional domains of Pseudomonas exotoxin identified by deletion analysis of the gene expressed in E. coli*. *Cell*, 1987. **48**(1): p. 129-36.
23. Hessler, J.L. and R.J. Kreitman, *An early step in Pseudomonas exotoxin action is removal of the terminal lysine residue, which allows binding to the KDEL receptor*. *Biochemistry*, 1997. **36**(47): p. 14577-82.

24. Chiron, M.F., C.M. Fryling, and D.J. FitzGerald, *Cleavage of pseudomonas exotoxin and diphtheria toxin by a furin-like enzyme prepared from beef liver*. J Biol Chem, 1994. **269**(27): p. 18167-76.
25. Ogata, M., et al., *Cell-mediated cleavage of Pseudomonas exotoxin between Arg279 and Gly280 generates the enzymatically active fragment which translocates to the cytosol*. J Biol Chem, 1992. **267**(35): p. 25396-401.
26. McKee, M.L. and D.J. FitzGerald, *Reduction of furin-nicked Pseudomonas exotoxin A: an unfolding story*. Biochemistry, 1999. **38**(50): p. 16507-13.
27. Chaudhary, V.K., et al., *Pseudomonas exotoxin contains a specific sequence at the carboxyl terminus that is required for cytotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(1): p. 308-12.
28. Theuer, C.P., et al., *The N-terminal region of the 37-kDa translocated fragment of Pseudomonas exotoxin A aborts translocation by promoting its own export after microsomal membrane insertion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(16): p. 7774-8.
29. Keppler-Hafkemeyer, A., R.J. Kreitman, and I. Pastan, *Apoptosis induced by immunotoxins used in the treatment of hematologic malignancies*. Int J Cancer, 2000. **87**(1): p. 86-94.
30. Kreitman, R.J., *Immunotoxins for targeted cancer therapy*. AAPS J, 2006. **8**(3): p. E532-51.
31. MacDonald, G.C., et al., *A phase I clinical study of intratumorally administered VB4-845, an anti-epithelial cell adhesion molecule recombinant fusion protein, in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck*. Med Oncol, 2009. **26**(3): p. 257-64.
32. Di Paolo, C., et al., *A recombinant immunotoxin derived from a humanized epithelial cell adhesion molecule-specific single-chain antibody fragment has potent and selective antitumor activity*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(7): p. 2837-48.
33. Foss, F.M., *Interleukin-2 fusion toxin: targeted therapy for cutaneous T cell lymphoma*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **941**: p. 166-76.
34. Li, S., S. Huang, and S.B. Peng, *Overexpression of G protein-coupled receptors in cancer cells: involvement in tumor progression*. Int J Oncol, 2005. **27**(5): p. 1329-39.
35. McCudden, C.R., et al., *G-protein signaling: back to the future*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(5): p. 551-77.
36. Tiwari, A., *GPR43: an emerging target for the potential treatment of type 2 diabetes, obesity and insulin resistance*. Curr Opin Investig Drugs, 2010. **11**(4): p. 385-93.
37. Rengo, G., A. Lymperopoulos, and W.J. Koch, *Future g protein-coupled receptor targets for treatment of heart failure*. Curr Treat Options Cardiovasc Med, 2009. **11**(4): p. 328-38.
38. Lagerstrom, M.C. and H.B. Schioth, *Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(4): p. 339-357.
39. Lefkowitz, R.J., *Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors*. Trends Pharmacol Sci, 2004. **25**(8): p. 413-22.
40. Wolfe, B.L. and J. Trejo, *Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis*. Traffic, 2007. **8**(5): p. 462-70.
41. Ji, T.H., M. Grossmann, and I. Ji, *G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions*. J Biol Chem, 1998. **273**(28): p. 17299-302.
42. Cheng, Y. and R. Lotan, *Molecular cloning and characterization of a novel retinoic acid-inducible gene that encodes a putative G protein-coupled receptor*. J Biol Chem, 1998. **273**(52): p. 35008-15.
43. Robbins, M.J., et al., *Molecular cloning and characterization of two novel retinoic acid-inducible orphan G-protein-coupled receptors (GPRC5B and GPRC5C)*. Genomics, 2000. **67**(1): p. 8-18.
44. Nagahata, T., et al., *Identification of RAI3 as a therapeutic target for breast cancer*. Endocr Relat Cancer, 2005. **12**(1): p. 65-73.

45. Hirano, M., et al., *Novel reciprocal regulation of cAMP signaling and apoptosis by orphan G-protein-coupled receptor GPRC5A gene expression*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **351**(1): p. 185-91.
46. Wu, Q., et al., *Integrative genomics revealed RAI3 is a cell growth-promoting gene and a novel P53 transcriptional target*. J Biol Chem, 2005. **280**(13): p. 12935-43.
47. Tao, Q., et al., *Identification of the retinoic acid-inducible Gprc5a as a new lung tumor suppressor gene*. J Natl Cancer Inst, 2007. **99**(22): p. 1668-82.
48. *Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends*. 2008, Robert Koch Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg): Berlin.
49. *Breast Cancer Facts & Figures 2009-2010*. 2009, American Cancer Society, Inc.: Atlanta.
50. Faneyte, I.F., et al., *Predicting early failure after adjuvant chemotherapy in high-risk breast cancer patients with extensive lymph node involvement*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(13): p. 4457-63.
51. Bartsch, R., C. Wenzel, and G.G. Steger, *Trastuzumab in the management of early and advanced stage breast cancer*. Biologics, 2007. **1**(1): p. 19-31.
52. Wang, T., et al., *Recent advances in selective estrogen receptor modulators for breast cancer*. Mini Rev Med Chem, 2009. **9**(10): p. 1191-201.
53. Stern, D.F., P.A. Heffernan, and R.A. Weinberg, *p185, a product of the neu proto-oncogene, is a receptorlike protein associated with tyrosine kinase activity*. 1986. p. 1729-1740.
54. Ross, J.S., et al., *The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy*. Oncologist, 2003. **8**(4): p. 307-25.
55. Cobleigh, M.A., et al., *Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease*. J Clin Oncol, 1999. **17**(9): p. 2639-48.
56. Vogel, C.L., et al., *Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer*. J Clin Oncol, 2002. **20**(3): p. 719-26.
57. Romond, E.H., et al., *Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer*. N Engl J Med, 2005. **353**(16): p. 1673-84.
58. Nahta, R., et al., *Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer*. Nat Clin Pract Oncol, 2006. **3**(5): p. 269-80.
59. Nahta, R. and F.J. Esteva, *HER2 therapy: molecular mechanisms of trastuzumab resistance*. Breast Cancer Res, 2006. **8**(6): p. 215.
60. Nagahata, T., et al., *Expression profiling to predict postoperative prognosis for estrogen receptor-negative breast cancers by analysis of 25,344 genes on a cDNA microarray*. Cancer Sci, 2004. **95**(3): p. 218-25.
61. Mishina, M., et al., *Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor*. Nature, 1986. **321**(6068): p. 406-11.
62. Brehm, P., *Resolving the structural basis for developmental changes in muscle ACh receptor function: it takes nerve*. Trends Neurosci, 1989. **12**(5): p. 174-7.
63. Witzemann, V., et al., *Developmental regulation of five subunit specific mRNAs encoding acetylcholine receptor subtypes in rat muscle*. FEBS Lett, 1989. **242**(2): p. 419-24.
64. Missias, A.C., et al., *Maturation of the acetylcholine receptor in skeletal muscle: regulation of the AChR gamma-to-epsilon switch*. Dev Biol, 1996. **179**(1): p. 223-38.
65. Taly, A., et al., *Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system*. Nat Rev Drug Discov, 2009. **8**(9): p. 733-50.
66. Horton, R.M., A.A. Manfredi, and B.M. Conti-Tronconi, *The 'embryonic' gamma subunit of the nicotinic acetylcholine receptor is expressed in adult extraocular muscle*. Neurology, 1993. **43**(5): p. 983-6.

67. Schluep, M., et al., *Acetylcholine receptors in human thymic myoid cells in situ: an immunohistological study*. Ann Neurol, 1987. **22**(2): p. 212-22.
68. Vincent, A., *Unravelling the pathogenesis of myasthenia gravis*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(10): p. 797-804.
69. Newton, W.A., Jr., et al., *Classification of rhabdomyosarcomas and related sarcomas. Pathologic aspects and proposal for a new classification--an Intergroup Rhabdomyosarcoma Study*. Cancer, 1995. **76**(6): p. 1073-85.
70. Walterhouse, D. and A. Watson, *Optimal management strategies for rhabdomyosarcoma in children*. Paediatr Drugs, 2007. **9**(6): p. 391-400.
71. Koscielniak, E., M. Morgan, and J. Treuner, *Soft tissue sarcoma in children: prognosis and management*. Paediatr Drugs, 2002. **4**(1): p. 21-8.
72. Gattenloehner, S., et al., *The fetal form of the acetylcholine receptor distinguishes rhabdomyosarcomas from other childhood tumors*. Am J Pathol, 1998. **152**(2): p. 437-44.
73. Gattenloehner, S., E.B. Brocker, and H.K. Muller-Hermelink, *Malignant melanoma with metastatic rhabdomyosarcomatoid transdifferentiation*. N Engl J Med, 2008. **358**(6): p. 649-50.
74. Drachman, D.B., et al., *Myasthenic antibodies cross-link acetylcholine receptors to accelerate degradation*. N Engl J Med, 1978. **298**(20): p. 1116-22.
75. Tzartos, S.J., et al., *Anatomy of the antigenic structure of a large membrane autoantigen, the muscle-type nicotinic acetylcholine receptor*. Immunol Rev, 1998. **163**: p. 89-120.
76. Tzartos, S., et al., *Demonstration of a main immunogenic region on acetylcholine receptors from human muscle using monoclonal antibodies to human receptor*. FEBS Lett, 1983. **158**(1): p. 116-8.
77. Vincent, A., et al., *Antibodies in myasthenia gravis and related disorders*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **998**: p. 324-35.
78. Fostieri, E., et al., *Isolation of potent human Fab fragments against a novel highly immunogenic region on human muscle acetylcholine receptor which protect the receptor from myasthenic autoantibodies*. Eur J Immunol, 2005. **35**(2): p. 632-43.
79. Matthews, I., et al., *Antibodies to acetylcholine receptor in parous women with myasthenia: evidence for immunization by fetal antigen*. Lab Invest, 2002. **82**(10): p. 1407-17.
80. Matthews, I., et al., *Production of Fab fragments against the human acetylcholine receptor from myasthenia gravis thymus lambda and kappa phage libraries*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **841**: p. 418-21.
81. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 3rd ed. 1996, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
82. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.F., *Current protocols in molecular biology*. 1995, New York: John Wiley & Sons, Inc.
83. Dahl, E., et al., *Molecular Profiling of Laser-Microdissected Matched Tumor and Normal Breast Tissue Identifies Karyopherin {alpha}2 as a Potential Novel Prognostic Marker in Breast Cancer*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(13): p. 3950-3960.
84. Harris, J.F., et al., *Increased frequency of both total and specific monoclonal antibody producing hybridomas using a fusion partner that constitutively expresses recombinant IL-6*. J Immunol Methods, 1992. **148**(1-2): p. 199-207.
85. Gattenloehner, S., et al., *Rhabdomyosarcoma lysis by T cells expressing a human autoantibody-based chimeric receptor targeting the fetal acetylcholine receptor*. Cancer Res, 2006. **66**(1): p. 24-8.
86. Stocker, M., et al., *Secretion of functional anti-CD30-angiogenin immunotoxins into the supernatant of transfected 293T-cells*. Protein Expr Purif, 2003. **28**(2): p. 211-9.
87. Tur, M.K., et al., *Recombinant CD64-specific single chain immunotoxin exhibits specific cytotoxicity against acute myeloid leukemia cells*. Cancer Res, 2003. **63**(23): p. 8414-9.

88. Lane, R.D., *A short-duration polyethylene glycol fusion technique for increasing production of monoclonal antibody-secreting hybridomas*. J Immunol Methods, 1985. **81**(2): p. 223-8.
89. Friguet, B., et al., *Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay*. J Immunol Methods, 1985. **77**(2): p. 305-19.
90. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
91. Wilson, C.M., *Staining of proteins on gels: comparisons of dyes and procedures*. Methods Enzymol, 1983. **91**: p. 236-47.
92. Remmele, W. and H.E. Stegner, *[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]*. Pathologe, 1987. **8**(3): p. 138-40.
93. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
94. Hanahan, D., *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. J Mol Biol, 1983. **166**(4): p. 557-80.
95. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
96. Stocker, M., et al., *Eukaryotic expression and secretion of EGFP-labeled annexin A5*. Protein Expr Purif, 2008. **58**(2): p. 325-31.
97. Cizeau, J., et al., *Engineering and biological characterization of VB6-845, an anti-EpCAM immunotoxin containing a T-cell epitope-depleted variant of the plant toxin bouganin*. J Immunother, 2009. **32**(6): p. 574-84.
98. Gattenlohner, S., et al., *A human recombinant autoantibody-based immunotoxin specific for the fetal acetylcholine receptor inhibits rhabdomyosarcoma growth in vitro and in a murine transplantation model*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 187621.
99. DeVita, V.T., Jr. and E. Chu, *A history of cancer chemotherapy*. Cancer Res, 2008. **68**(21): p. 8643-53.
100. Klein, S., F. McCormick, and A. Levitzki, *Killing time for cancer cells*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(7): p. 573-80.
101. Kiefer, H., R. Vogel, and K. Maier, *Bacterial expression of G-protein-coupled receptors: prediction of expression levels from sequence*. Receptors Channels, 2000. **7**(2): p. 109-19.
102. Kiefer, H., K. Maier, and R. Vogel, *Refolding of G-protein-coupled receptors from inclusion bodies produced in Escherichia coli*. Biochem Soc Trans, 1999. **27**(6): p. 908-12.
103. Kiefer, H., *In vitro folding of alpha-helical membrane proteins*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1610**(1): p. 57-62.
104. Kiefer, H., et al., *Expression of an olfactory receptor in Escherichia coli: purification, reconstitution, and ligand binding*. Biochemistry, 1996. **35**(50): p. 16077-84.
105. Fujimoto, A., et al., *Production of human antibodies to native cytokine receptors using the genetic immunization of KM mice*. Hum Antibodies, 2009. **18**(3): p. 75-80.
106. Sangawa, T., T. Nogi, and J. Takagi, *A murine monoclonal antibody that binds N-terminal extracellular segment of human protease-activated receptor-4*. Hybridoma (Larchmt), 2008. **27**(5): p. 331-5.
107. Andersson, H., et al., *Membrane assembly of the cannabinoid receptor 1: impact of a long N-terminal tail*. Mol Pharmacol, 2003. **64**(3): p. 570-7.
108. Wallin, E. and G. von Heijne, *Properties of N-terminal tails in G-protein coupled receptors: a statistical study*. Protein Eng, 1995. **8**(7): p. 693-8.
109. Jorissen, H., et al., *Production and characterisation of monoclonal antibodies against RAI3 and its expression in human breast cancer*. BMC Cancer, 2009. **9**: p. 200.
110. Anderson, L. and J. Seilhamer, *A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver*. Electrophoresis, 1997. **18**(3-4): p. 533-7.

111. Guo, Y., et al., *How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2008. **40**(5): p. 426-36.
112. Brockmann, R., et al., *Posttranscriptional Expression Regulation: What Determines Translation Rates?* PLoS Computational Biology, 2007. **3**(3): p. e57.
113. Hartung, T., Balls, M., Bardouille, C., Blanck, O., Coecke, S., Gstraunthaler, G., Lewis, D., *Good Cell Culture Practice. ECVAM Good Cell Culture Practice Task Force Report 1*. Altern Lab Anim 2000. **30**: p. 407–414.
114. Ye, X. and R. Lotan, *Potential misinterpretation of data on differential gene expression in normal and malignant cells in vitro*. Brief Funct Genomic Proteomic, 2008.
115. Barth, S., et al., *Compatible-solute-supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions*. Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(4): p. 1572-9.
116. Stein, C., et al., *Novel conjugates of single-chain Fv antibody fragments specific for stem cell antigen CD123 mediate potent death of acute myeloid leukaemia cells*. Br J Haematol, 2010.
117. Beers, R., et al., *Immunotoxins with increased activity against epidermal growth factor receptor vIII-expressing cells produced by antibody phage display*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(7): p. 2835-43.
118. Won, J., et al., *Higher cytotoxicity of divalent antibody-toxins than monovalent antibody-toxins*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **382**(1): p. 15-20.
119. Hexham, J.M., et al., *Influence of relative binding affinity on efficacy in a panel of anti-CD3 scFv immunotoxins*. Mol Immunol, 2001. **38**(5): p. 397-408.
120. Thompson, J., et al., *Improved binding of a bivalent single-chain immunotoxin results in increased efficacy for in vivo T-cell depletion*. Protein Eng, 2001. **14**(12): p. 1035-41.
121. Ribbert, T., et al., *Improved efficacy by increased valency, both in vitro, as well as in vivo in a chronic cutaneous inflammation model in hCD64 transgenic mice*. Br J Dermatol, 2010.
122. Pavlinkova, G., et al., *Pharmacokinetics and biodistribution of engineered single-chain antibody constructs of MAb CC49 in colon carcinoma xenografts*. J Nucl Med, 1999. **40**(9): p. 1536-46.
123. Colcher, D., et al., *Pharmacokinetics and biodistribution of genetically-engineered antibodies*. Q J Nucl Med, 1998. **42**(4): p. 225-41.
124. Shimamura, T., et al., *Interleukin-4 cytotoxin therapy synergizes with gemcitabine in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Cancer Res, 2007. **67**(20): p. 9903-12.
125. Bruell, D., et al., *The recombinant anti-EGF receptor immunotoxin 425(scFv)-ETA' suppresses growth of a highly metastatic pancreatic carcinoma cell line*. Int J Oncol, 2003. **23**(4): p. 1179-86.
126. Barth, S., et al., *Ki-4(scFv)-ETA', a new recombinant anti-CD30 immunotoxin with highly specific cytotoxic activity against disseminated Hodgkin tumors in SCID mice*. Blood, 2000. **95**(12): p. 3909-14.
127. Singh, R., et al., *Target-specific cytotoxic activity of recombinant immunotoxin scFv(MUC1)-ETA on breast carcinoma cells and primary breast tumors*. Mol Cancer Ther, 2007. **6**(2): p. 562-9.
128. Schwemmlein, M., et al., *A CD33-specific single-chain immunotoxin mediates potent apoptosis of cultured human myeloid leukaemia cells*. Br J Haematol, 2006. **133**(2): p. 141-51.
129. Bang, S., et al., *HA22 (R490A) is a recombinant immunotoxin with increased antitumor activity without an increase in animal toxicity*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(4): p. 1545-50.

130. Li, Q., et al., *Cytotoxic activity of the recombinant anti-mesothelin immunotoxin, SS1(dsFv)PE38, towards tumor cell lines established from ascites of patients with peritoneal mesotheliomas*. *Anticancer Res*, 2004. **24**(3a): p. 1327-35.
131. Ho, M., et al., *In vitro antibody evolution targeting germline hot spots to increase activity of an anti-CD22 immunotoxin*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(1): p. 607-17.
132. Kreitman, R.J., et al., *Phase II trial of recombinant immunotoxin RFB4(dsFv)-PE38 (BL22) in patients with hairy cell leukemia*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(18): p. 2983-90.
133. Kreitman, R.J., et al., *Phase I trial of continuous infusion anti-mesothelin recombinant immunotoxin SS1P*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(16): p. 5274-9.
134. von Minckwitz, G., et al., *Phase I clinical study of the recombinant antibody toxin scFv(FRP5)-ETA specific for the ErbB2/HER2 receptor in patients with advanced solid malignomas*. *Breast Cancer Res*, 2005. **7**(5): p. R617-26.
135. Gattenloehner, S., et al., *A comparison of MyoD1 and fetal acetylcholine receptor expression in childhood tumors and normal tissues: implications for the molecular diagnosis of minimal disease in rhabdomyosarcomas*. *J Mol Diagn*, 1999. **1**(1): p. 23-31.
136. Riemersma, S., et al., *Association of arthrogryposis multiplex congenita with maternal antibodies inhibiting fetal acetylcholine receptor function*. *J Clin Invest*, 1996. **98**(10): p. 2358-63.
137. Hassan, R., et al., *Anti-mesothelin immunotoxin SS1P in combination with gemcitabine results in increased activity against mesothelin-expressing tumor xenografts*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(23): p. 7166-71.
138. Zhang, Y., et al., *Synergistic antitumor activity of taxol and immunotoxin SS1P in tumor-bearing mice*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(15): p. 4695-701.
139. Kirchner, T., et al., *[Nicotinic acetylcholine receptors in tumors with rhabdomyomatous differentiation. Immunohistochemical and molecular genetic demonstration]*. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 1990. **74**: p. 409-14.
140. Stahnke, B., et al., *Granzyme B-H22(scFv), a human immunotoxin targeting CD64 in acute myeloid leukemia of monocytic subtypes*. *Mol Cancer Ther*, 2008. **7**(9): p. 2924-32.
141. Hetzel, C., et al., *Small cleavable adapters enhance the specific cytotoxicity of a humanized immunotoxin directed against CD64-positive cells*. *J Immunother*, 2008. **31**(4): p. 370-6.
142. Huhn, M., et al., *Human angiogenin fused to human CD30 ligand (Ang-CD30L) exhibits specific cytotoxicity against CD30-positive lymphoma*. *Cancer Res*, 2001. **61**(24): p. 8737-42.
143. Rybak, S.M., et al., *Ribonucleases and immunoRNases as anticancer drugs*. *Curr Pharm Des*, 2009. **15**(23): p. 2665-75.

VII ANHANG

VII.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|---|
| ABTS | 2,2'-Azino-di-(3-Ethylbenzthiazolinsulfonat) |
| AChR | Acetylcholinrezeptor |
| ADCC | Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AML | akute myeloische Leukämie |
| Amp | Ampizillin |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| BP | Beschichtungspuffer |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| CD | „Cluster of differentiation“ |
| cDNA | Komplementäre DNA |
| CDR | „complementarity determining region“ |
| C _H 1-3 | Konstante Domänen der schweren Immunglobulinkette |
| C _L | Konstante Domäne der leichten Immunglobulinkette |
| DAB | 3,3'-Diaminobenzidine |
| ddNTP | Didesoxyribonucleosidtriphosphat (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonucleosidtriphosphat (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) |
| DT | Diphtherietoxin |
| ECL | „Enhanced chemiluminescence“ |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| eEF2 | eukaryotischer Elongationsfaktor 2 |
| EGFR | Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor |
| ELISA | „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ |
| ETA | Exotoxin A aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| ETA' | Bindedomäne-deletiertes ETA |
| Fab | Antigenbindendes Fragment |
| fAChR | Fetaler Acetylcholinrezeptor |
| FACS | “Fluorescent Activated Cell Sorting“ |
| Fc | Kristallines Fragment |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FITC | Fluoreceinisothiocyanat |
| FKS | Fötale Kälberserum |
| FPLC | “Fast Protein Liquid Chromatography“ |
| FSC | “Forward Scatter“ ,Vorwärtsstreulicht |
| GAM | “goat anti-mouse“ Ziege anti-Maus |
| GAPDH | Glyceraldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase |
| GAR | “goat anti-rabbit“ Ziege anti-Kaninchen |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| GPCR | G-Protein-gekoppelter Rezeptor |
| GTP | Guanosintriphosphat |

| | |
|----------------|--|
| HAMA | “human anti-murine antibody” |
| HAT | Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin |
| HRPO | “horse raddish peroxidase” Meerrettichperoxidase |
| i.p. | intraperitoneal |
| Ig | Immunglobulin |
| IgG | Immunglobulin der Klasse G |
| IMAC | Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie |
| kDa | Kilodalton |
| LD | „limiting dilution“ |
| mAk | Monoklonaler Antikörper |
| MG | Myasthenia gravis |
| mIL-6 | Murines Interleukin 6 |
| mRNA | „messenger“ RNA |
| NTA | Nitrilo-tri-essigsäure |
| PAA | Polyacrylamid |
| PAGE | Polyacrylamid Gelelektrophorese |
| PAX-FKHR | Genfusion „paired box-forkhead related transcription factor“ |
| PBS | Phosphatgepufferte Saline |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PI | Propidiumiodid |
| PO | Peroxidase |
| RAI | “Retionic acid induced” |
| RIP | Ribosomeninaktivierendes Protein |
| RMS | Rhabdomyosarkom |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT | Reverse Transkriptase, Raumtemperatur |
| scFv | Single chain Antikörper der variablen Antikörperregionen |
| SDS | Sodiumdodecylacetat |
| siRNA | „Small interfering“ RNA |
| SSC | “Sideward Scatter“, Seitwärtsstreulicht |
| TAE | Tris/Acetat/EDTA |
| TMA | „Tissue Microarry“ |
| üN | Über Nacht |
| upm | Umdrehung pro Minute |
| UV | Ultra Violet |
| V _H | Variable Domäne der schweren Immunglobulinkette |
| V _L | Variable Domäne der leichten Immunglobulinkette |

VII.2 Vektorkarten

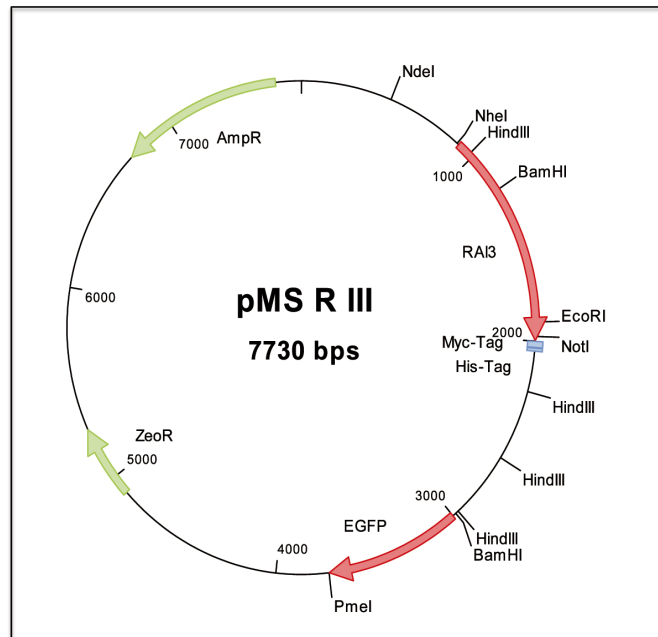


Abbildung VII-1 Vektorkarte pMS RIII

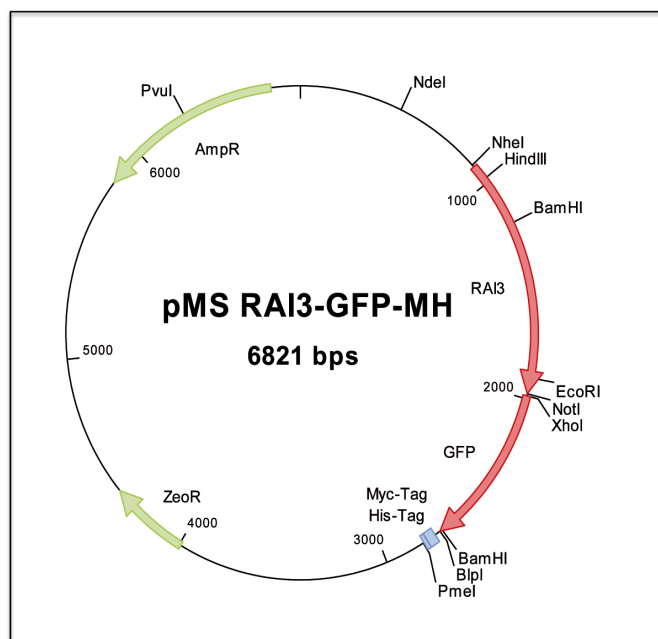


Abbildung VII-2 Vektorkarte pMS RGFP MH

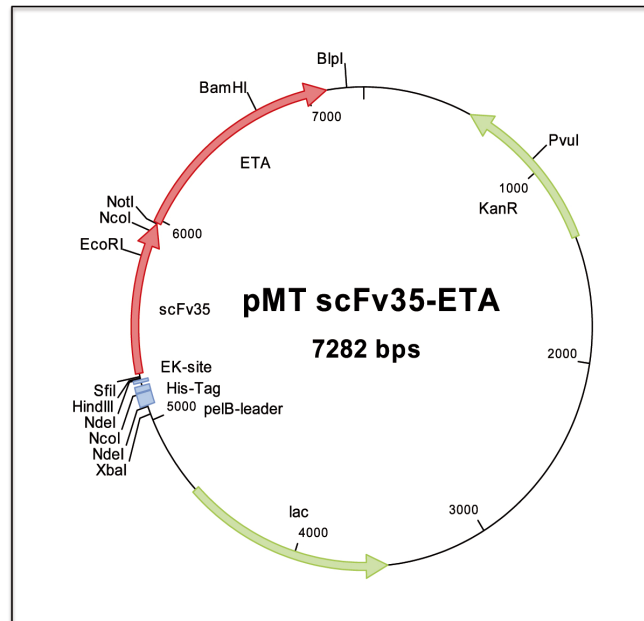


Abbildung VII-3 Vektorkarte pMT scFv35-ETA'

VII.3 Primersequenzen

Tabelle VII-1 Übersicht der Primersequenzen

| RAI3 Klonierung | |
|-------------------------|--|
| RAI3 Nhe Kozak for | 5'-CATT <u>CGAGGCT</u> AgccaccATGGCTACAACAGTCCCTG-3' * |
| RAI3 Not back | 5'-ACTTGT <u>CAGCGGCCGCG</u> CTGCCCTCTTTCTTTACTTC-3' * |
| RT-PCR Primer | |
| CHRNA fwd | 5'-AAGCTACTGTGAGATCATCGT-3' |
| CHRNA rev | 5'-TGACGAAGTGGTAGGTGATGT-3' |
| CHRNA fwd | 5'-ATCTCAGTCACCTACTTCCCC-3' |
| CHRNA rev | 5'-TACTTGCTGATGAGTGGCACC-3' |
| PAX-FKHR fwd | 5'-AGCTCACCGAGGCCCGAGT-3' |
| PAX-FKHR rev | AACTGTGATCCAGGGCTGTC-3' |
| GAPDH for | 5'-GGTATCGTGGAAGGACTCATGAC-3' |
| GAPDH rev | 5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG -3' |
| Sequenzierprimer | |
| pMS-Seq-Sac-back | 5'-GCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCC-3' |
| IVS-IRES-for | 5'-AAACTGACAATCTTAGCGCAGAAGTCATGC-3' |
| H6 for | 5'-TTAAACTCAATGATGATGATGATGATG-3' |
| T7 Prom | 5'-AATACGACTCACTATAG-3' |
| T7 Term | 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3' |
| scFv35 3 | 5'-CTACACAGGAGACTCTCA-3' |
| scFv35 5 | 5'-GACCAAGCTGGAGATCA-3' |

*Restriktionsschnittstellen sind durch Unterstreichen gekennzeichnet. Kleine Buchstaben kennzeichnen die KOZAK-Sequenz.

VII.4 RAI3 Aminosäuresequenz

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | |
| MATTVPDGCR | NGLKSKYYRL | CDKAEAWGIV | LETVATAGVV | TSVAFMLTLP | ILVCKVQDSN | |
| 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | |
| RRKMLPTQFL | FLLGVLGIFG | LTFAFIIGLD | GSTGPTRFFL | FGILFSICFS | CLLAHAVSLT | |
| 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | |
| KLVRGRKPLS | LLVILGLAVG | FSLVQDVIAI | EYIVLTMNRT | NVNVFSELSA | PRRNEDFVLL | |
| 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 | |
| LTIVLFLMAL | TFLMSSF | TFC | GSFTGWKRHG | AHIYLTMLLS | IAIWVAWITL | LMLPDFDRRW |
| 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 | |
| DDTILSSALA | ANGWVFLAY | VSPEFWLLTK | QRNPMDYPVE | DAFCKPQLVK | KSYGVENRAY | |
| 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | | |
| SQEEITQGF | ETGDTLYAPY | STHFQLQNP | PQKEFSIPRA | HAWPSPYKDY | EVKKEGS | |

Abbildung VII-4 RAI3 Aminosäuresequenz

Die vorgehobenen Abschnitte kennzeichnen die N-terminale Domäne (blau) und die sieben Transmembrandomänen (gelb) des Rezeptors.

VII.5 Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------------------|--|----|
| Abbildung I-1 | Varianten der gängigen Antikörper und Antikörperfragmente..... | 4 |
| Abbildung I-2 | Schematische Darstellung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors. | 8 |
| Abbildung I-3 | Fetale und adulte Form des Acetylcholinrezeptors | 11 |
| Abbildung I-4 | Übersicht Ablauf der Doktorarbeit. | 14 |
| Abbildung III-1 | SDS-PAGE des Antigens RAI3..... | 40 |
| Abbildung III-2 | Schema des zeitlichen Ablaufs der RAI3-Immunsierung. | 41 |
| Abbildung III-3 | ELISA zur Bestimmungen des RAI3-spezifischen Antikörpertiters im Mausserum..... | 42 |
| Abbildung III-4 | Demonstration der spezifischen Antigenbindung der Hybridomaüberstände. | 43 |
| Abbildung III-5 | SDS-PAGE und Western Blot-Analyse der Protein G Reinigung exemplarisch dargestellt für mAk 24 2.1. | 45 |
| Abbildung III-6 | Kompetitiver ELISA der monoklonalen anti-RAI3 Antikörper. | 46 |
| Abbildung III-7 | Bindungsanalyse der anti-RAI3 Antikörper an Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 (A) und Pankreaszelllinie ASPC-1 (B). | 47 |
| Abbildung III-8 | Western Blot-Analyse von Zelllysaten der RAI3-positiven Zelllinien MDA- MB-231 und ASPC-1 und HEK293T als Negativkontrolle..... | 48 |
| Abbildung III-9 | Western Blot-Analyse von Lysaten aus Mammakarzinom-Geweben. | 49 |
| Abbildung III-10 | Schema der Expressionskassetten von RAI3 (A) und RAI3-GFP (B). | 50 |

| | | |
|------------------|--|-----|
| Abbildung III-11 | Kontrolle der erfolgreichen RAI3-Expression mittels GFP Reporter-Gen (Dotplots) und Bindungsanalyse der anti-RAI3 Antikörper an RAI3-transfizierte HEK293T Zellen (Histogramme)..... | 51 |
| Abbildung III-12 | Western Blot-Analyse von Zelllysaten RAI3- und RAI3GFP-transfizierter HEK293T Zellen sowie Kontroll-Transfektanten. | 52 |
| Abbildung III-13 | Immunofluoreszenzfärbung RAI3-GFP transfizierter HEK293T Zellen. | 53 |
| Abbildung III-14 | Kompetition der Färbung von RAI3 in der Immunhistochemie. | 55 |
| Abbildung III-15 | TMA von Mammarkarzinom- und Mamma-Normalgeweben. | 56 |
| Abbildung III-16 | Analyse der AChR-Expression mittels RT-PCR der verschiedenen Rhabdomyosarkom- und Kontrollzelllinien. | 58 |
| Abbildung III-17 | Schematische Darstellung der Expressionsskassette für scFv35-ETA' | 59 |
| Abbildung III-18 | Fermentation scFv35-ETA im 4 L Maßstab unter osmotischem Stress. | 60 |
| Abbildung III-19 | SDS-PAGE zur Demonstration der Reinigung von scFv35-ETA' mittels IMAC und Anionenaustauschchromatographie. | 61 |
| Abbildung III-20 | Größenausschlusschromatographie von scFv35-ETA'. | 63 |
| Abbildung III-21 | Bindungsanalyse von scFv35-ETA' auf RMS und Kontrollzelllinien. | 64 |
| Abbildung III-22 | Bestimmung der funktionalen Affinität von scFv35-ETA' auf drei verschiedenen RMS- Zelllinien. | 65 |
| Abbildung III-23 | Zeitlicher Verlauf der Internalisierung von scFv35-ETA' für drei verschiedene RMS Zelllinien. | 66 |
| Abbildung III-24 | SDS-PAGE und Western Blot-Analyse der eingesetzten Proben. | 67 |
| Abbildung III-25 | XTT-Zytotoxizitätstest von scFv35-ETA' auf fAChR-positiven RMS-Zellen und fAChR-negativen Kontrollzellen. | 68 |
| Abbildung III-26 | Kompetitiver XTT-Zytotoxizitätstest auf RD Zellen. | 69 |
| Abbildung III-27 | Demonstration der Apoptoseinduktion durch scFv35-ETA' auf RD und A-204 Zellen. | 70 |
| Abbildung III-28 | Untersuchung der Serumstabilität von scFv35-ETA' mittels Western Blot und Durchflusszytometrie. | 72 |
| Abbildung III-29 | Behandlung von subkutanen Tumoren der RD-Zelllinie in SCID Mäusen mit scFv35-ETA'. | 73 |
| Abbildung VII-1 | Vektorkarte pMS RIII | iii |
| Abbildung VII-2 | Vektorkarte pMS RGFP MH | iii |
| Abbildung VII-3 | Vektorkarte pMT scFv35-ETA' | iv |
| Abbildung VII-4 | RAI3 Aminosäuresequenz..... | v |

VERÖFFENTLICHUNGEN

Publikationen

1. Jörißen H, Bektas N, Dahl E, Hartmann A, ten Haaf A, Di Fiore S, Kiefer H, Thess A, Barth S, Klockenbring T. Production and characterisation of monoclonal antibodies against RAI3 and its expression in human breast cancer. *BMC Cancer*, 2009. **9**: p. 200.
2. Gattenlöhner S, Jörißen H, Huhn M, Vincent A, Beeson D, Tzartos S, Mamalaki A, Etschmann B, Muller-Hermelink HK, Koscielniak E, Barth S, Marx A. A human recombinant autoantibody-based immunotoxin specific for the fetal acetylcholine receptor inhibits rhabdomyosarcoma growth in vitro and in a murine transplantation model. *J Biomed Biotechnol*, 2010. **2010**: p. 187621.

Posterpräsentationen

1. Bruch H, Bektas N, Klockenbring T, Ten Haaf A, Fischer R, Dahl E, Barth S. Generation of monoclonal antibodies against RAI3 - a potential prognostic marker for breast cancer. Biomedica April 2008, Maastricht. Poster.
2. Jörißen H, Gattenlöhner S, Barth S. Biological characterization of a human autoantibody-based immunotoxin targeting the fetal acetylcholine receptor for the treatment of rhabdomyosarcoma. AIO Symposium Nov 2009, Berlin. Poster.
3. Jörißen H, Gattenlöhner S, Barth S. Charakterisierung eines neuen rekombinanten Immuntoxins gegen den fetalen Acetylcholinrezeptor. DKK Feb 2010, Berlin. ePoster mit Kurzvortrag.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die mich in fachlicher oder persönlicher Hinsicht während meiner Dissertation unterstützt haben.

Dabei gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Rainer Fischer für die Möglichkeit, meine Dissertation am Fraunhofer Insitut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie in Aachen durchzuführen zu können sowie für die Übernahme des Referats und die Korrektur der Arbeit.

Außerdem danke ich herzlich Herrn Prof Dr. Dr. Stefan Barth für die Übernahme des Koreferats und die wissenschaftliche Betreuung, die hilfreichen Diskussionen, das mir entgegengebrachte Vertrauen und den zugestandenen Freiraum bei der Mitgestaltung der Projekte.

Herrn Prof. Dr. Wilhelm Jahnen-Dechent danke ich für die Bereitschaft, als Drittprüfer zur Verfügung zu stehen.

Ich danke Herrn Dr. Torsten Klockenbring für die wissenschaftliche Betreuung bei der Antikörpergenerierung und -charakterisierung sowie seine stetige Unterstützung.

Ich danke herzlich allen Mitarbeitern des Fraunhofer IME, des Instituts für Biologie VII der RWTH Aachen sowie der Arbeitsgruppe EMI des Helmholtz-Institutes, Aachen, die mich direkt oder indirekt bei den Arbeiten für diese Dissertation unterstützt und für eine tolle Arbeitsatmosphäre gesorgt haben. Besonders erwähnt seien dabei Nicole Redding und Gudrun Breuer für ihre Unterstützung in der „Hybridoma-Unit“, Stefano Di Fiore für die Unterstützung bei der Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung und der geduldigen Auswertung sowie Dirk Scheffler und Reinhard Rosinke für den unermüdlichen technischen Support bei der bakteriellen Expression sowie Proteinreinigung.

Ein ganz besonderer Dank von Herzen geht an meine lieben Doktorandenkolleginnen Alessa Pardo, Christiane Püttmann und Katharina Kolberg alias „die Mädels“. Danke für die tolle Zeit am IME, die gegenseitige Unterstützung in wissenschaftlichen oder persönlichen Angelegenheiten, das Lachen und Witzeln, das gegenseitige Aufbauen und Motivieren, das Trösten, das Miteinander.

Ich danke auch unseren Kooperationspartnern aus dem Institut für Pathologie am Uniklinikum Aachen für die Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der Immunhistochemie sowie für die Bereitstellung des Materials und die gute Zusammenarbeit. Dabei möchte ich vor allem Prof. Dr. Edgar Dahl und Dr. Nuran Bektas danken.

Ich danke unserem Kooperationspartner Prof. Dr. Hans Kiefer von der Firma M-Fold Biotech GmbH, Tübingen für die gute Zusammenarbeit im RAI3-Projekt.

Prof. Dr. Stefan Gattenlöhner aus der Universität Würzburg danke ich für die gute Kooperation im Rahmen des fAChR-Projektes.

Ich danke meinen lieben Freunden, die mich immer unterstützt haben und mich so gut auf andere Gedanken bringen konnten.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Christoph, der mir immer zur Seite stand, unglaublich viel Verständnis für meine Launen aufgebracht hat und mich stets zum Lachen bringen konnte.

Zu guter letzt möchte ich meiner Familie danken. Meinen Eltern, für ihr Vertrauen in mich, ihre Unterstützung und ihren elterlichen Stolz. Meinen Schwestern danke ich besonders für ihre Freundschaft und den unzerbrechlichen Zusammenhalt.